

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

SNP polymorfismus na Y chromozomu u populace afrických
Fulbů

Diplomová práce

Jana Bučková

2010

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra antropologie a genetiky člověka

SNP polymorfismus na Y chromozomu u populace afrických Fulbů

Diplomová práce

Jana Bučková

Vedúci diplomovej práce:

Mgr. Viktor Černý, Dr.

Praha 2010

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne s použitím literatúry uvedenej v zozname.

V Prahe, dňa.....

Podpis.....

PodĎakovanie:

Moje veľké ďakujem patrí Viktorovi Černému za odborné vedenie tejto diplomovej práce. Za jeho cenné rady a pripomienky.

Ďalšie veľké ďakujem patrí Mgr Alžbete Vašíkovej, PhD za zaškolenie do práce s Luminexom a pomoc pri riešení počiatočných problémov.

Ďalej sa chcem poďakovať Dr. Luise Pereira za pomoc a zoznámenie so štatistickým programom Arlequin.

A nakoniec sa chcem poďakovať mojej rodine za trpezlivosť a podporu počas celého môjho štúdia.

Táto práca bola vypracovaná v Laboratóriu archeogenetiky Akademie vied v Prahe a laboratóriách Oddelenia molekulárnej genetiky Ústavu hematologie a krevní transfúze v Prahe. Celá táto práca bola podporovaná z výskumného zámeru GAČR 206/08/1587.

ABSTRAKT

Markery nerekombinujúcej časti chromozómu Y predstavujú vhodný nástroj na štúdium diverzity jednotlivých populácií. Najbežnejšími polymorfizmami ľudského genómu sú SNPs. Mutačná rýchlosť SNPs je pomerne malá a preto majú svoje využitie ako genetické markery v evolučných a populačných štúdiách.

V rámci tejto práce sme analyzovali 205 nepříbuzných mužských vzoriek DNA z 11 subsaharských fulbských subpopulácií z 5 štátov Afrického Sahelu. Fulbovia sú etnickou skupinou, ktorá je rozšírená vo viacerých štátoch, hlavne západnej Afriky. Naše vzorky pochádzajú z oblasti Tindangou, Banfora (Burkina Faso), Bongor, Linia (Čad), Diafarabé (Mali), Tcheboua (Kamerun), Balatungur, Diffa, Zinder, Ader a Abalak (Niger). Vyžitím kitu Signet Y-SNP Identification Systems a prístroja Luminex s LabMAP Luminex technológiou sme detegovali jednotlivé SNPs chromozómu Y. LabMAP Luminexová technológia je univerzálna čipová platforma, ktorá ako sondy využíva fluorescenčne značené polystyrénové mikrosféry.

Zaznamenali sme výskyt 12 rôznych haploskupín. Do typický africkej haploskupiny E, ktorá je definovaná prítomnosťou odvodenej alely v polymorfizme M96 patrí 89,3% jedincov. U 7,8% z celkového počtu jedincov sme detegovali haploskupinu R, ktorá je charakteristická pre eurázijskú populáciu. Na vytváraní genofondu populácie Fulbov sa podieľali jednak východoafrické a jednak západoafrické populácie. Až tretina populácie Fulbov zdieľa práve východoafrické haploskupiny, ktoré sa v ostatných populáciách západnej a strednej Afriky nevyskytujú.

Kľúčové slová: Fulbovia; Y chromozóm; SNP; haploskupiny; subsaharská Afrika; nomádsky pastieri

ABSTRAKT

Markers on the non-recombining region of chromosome Y is a useful tool for study of diversity between populations. SNPs are the most common polymorphisms in human genome. Mutation rate of SNPs is very low and so they may be used as genetic markers in evolutionary and population studies.

We have analyzed 205 unrelated men from 11 Sub-Saharan Fulani's subpopulations. Fulani are an ethnic group of people spread over many countries, mainly in West Africa. Our samples are from Tindangou area, Banfora area (Burkina Faso), Bongor area, Linia area (Chad), Diafarabé area (Mali), Tcheboua area (Cameroon), Banfora area, Diffa area, Zinder area, Ader area and Abalak area (Niger). Using kit Signet Y-SNP Identification Systems and Luminex instrument with LabMAP Luminex Technology we detected particular Y chromosome's SNPs. LabMAP Luminex Technology is universal array platform, which as a probe using fluorescent polystyrene microspheres.

We have observed 12 different haplogroups. Haplogroup E, which is typical African haplogroups, is determined with derived allele in polymorphism M96. We have detected haplogroup E in maximum of 89,3% in the Fulani's subpopulations. In 7,8% we have detected haplogroup R, which is characteristic of populations in the Euroasia. Gene pool of Fulani's population is influenced with a Western and Eastern African population. A third of Fulani's population share Eastern African haplogroups, which weren't detected in other populations of Western and Central Africa.

Keywords: Fulani; Y Chromosome; SNPs; haplogroups; Sub-Saharan Africa; nomad herdsman

Obsah

ÚVOD.....	3
1 LITERÁRNY PREHĽAD.....	5
1.1 Geografická charakteristika.....	5
1.1.1 Africký kontinent.....	5
1.1.2 Púšť Sahara.....	5
1.2 Prehistória Sahary.....	6
1.2.1 Ranný Holocén (9800 – 7400 rokov B.P).....	7
1.2.2 Stredný holocén (7400 – 3500 rokov B.P).....	7
1.2.3 Neskorý holocén (3500 – súčasnosť).....	8
1.3 Fulbovia.....	9
1.3.1 História Fulbov.....	10
1.4 Y Chromozóm.....	13
1.4.1 Štruktúra Y chromozómu.....	13
1.4.2 Gény chromozómu Y.....	14
1.4.3 Špecifické črty chromozómu Y.....	15
1.4.4 Y chromozomálny strom a nomenklatura haploskupín.....	15
1.4.5 Vytváranie Y chromozómovej diverzity.....	18
1.5 Molekulárne markery v antropologických genetických štúdiach.....	20
1.5.1 Autozomálne markery.....	21
1.5.2 SNP polymorfizmy.....	22
1.5.3 Tandemové repetície.....	23
1.5.4 Retroelementy.....	24
1.5.5 Náhodne amplifikovaná polymorfická DNA (RAPD).....	25
1.5.6 Markery chromozómu Y.....	26
1.5.7 Markery mtDNA.....	26
1.5.8 Polymorfizmy chromozómu X.....	27
1.6 Haploskupiny chromozómu Y.....	28
2 CIELE PRÁCE.....	39
3 MATERIÁL.....	40
3.1 Vzorky DNA.....	40
3.2 Signet Y-SNP Identification System.....	42
4 METÓDY.....	45
4.1 Izolácia DNA.....	45

4.2 Gélová elektroforéza.....	45
4.3 Polymerázová reťazová reakcia.....	47
4.4 Technológia LabMAP Luminex.....	47
4.5 Pracovný protokol na analýzu SNPs chromozómu Y.....	49
4.5.1 Použité prístroje a materiál.....	49
4.5.2 Amplifikácia Y-chromozómovej DNA.....	50
4.5.3 Fluorescenčné značenie amplifikovanej DNA.....	51
4.5.4 Alelický špecifická hybridizácia.....	52
4.5.5 Detekcia Y-SNPs pomocou prístroja Luminex 100.....	53
5 VÝSLEDKY.....	54
5.1 Haploskupiny a ich frekvencie výskytu.....	54
5.2 Fst analýza.....	61
5.3 Génová diverzita.....	64
6 DISKUSIA.....	66
7 ZÁVER.....	80
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	81
9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	83
PRÍLOHY.....	96
Príloha 1 Zoznam roztokov a chemikálií použitých v tejto práci.....	97
Príloha 2 Kompletne výsledky Fst analýz všetkých 37 populácií.....	99
Príloha 3 Kompletne výsledky štatistických analýz programu Arlequin 3.1.....	100
Príloha 4 Y chromozómový strom (YCC, 2002) a kompletne vetvenie haploskupiny E a R (Karafet et al., 2008).....	101

ÚVOD

Každý z nás má svoju históriu zapísanú v štruktúre DNA, ktorá sa prenáša z generácie na generáciu. Archeologické a kostené nálezy podliehajú skaze času, ale informácia o našej minulosti, ktorú máme zapísanú v podobe štyroch písmen ATGC v štruktúre DNA je nezničitelná. V štruktúre DNA je teda zapísaná celá história ľudstva, migrácie našich predkov. Geografický pôvod a sledovanie histórie ľudstva, ich migrácií a postupné osídľovanie jednotlivých oblastí sveta sú predmetom štúdia množstva vedeckých prác. SNP polymorfizmy, ktoré boli použité aj v tejto štúdií, sa vďaka svojej nízkej mutačnej rýchlosti a ich pomerne častého výskytu v genóme výborne hodia pri analýzach tohto typu. Nízka mutačná rýchlosť nám zabezpečí, že v danom mieste nedôjde k mutáciám dvakrát a ani k spätnej mutácií.

Analýzy mtDNA spolu s analýzami chromozómu Y sa v súčasnej dobe dostávajú do popredia pri sledovaní evolučných a migračných udalostí minulých populácií. Štúdium chromozómu Y, konkrétne jeho nerekombinujúcej (NRY) oblasti, je v porovnaní s výskumom mtDNA ešte novinkou vedeckého poľa populačnej a evolučnej genetiky. Zatiaľ čo prvé analýzy mtDNA sa uskutočnili už v 70. rokoch 20. storočia, tak chromozóm Y sa začal študovať až v 90. rokoch minulého storočia. Y chromozóm má oproti ostatným markerom určité výhody v evolučno-genetických štúdiách. Keďže prevažná časť chromozómu Y nepodlieha rekombináciám umožňuje nám to sledovanie iba paternálnej línie a tým následne určiť rozdielnu rýchlosť migrácie mužov a žien či analýzu patrilokality a matrilokality. Molekulárno-genetické markery nerekombinujúcej oblasti chromozómu Y majú bohaté využitie vo viacerých výskumných odvetviach zahŕňajúc evolučnú biológiu a genetiku, forenznú genetiku, lekársku genetiku a genealogické rekonštrukcie.

Využitie prístroja Luminex na detekciu polymorfizmov jednotlivých lokusov nám umožňuje pomerne rýchlo, jednoducho a presne určiť jednotlivé polymorfizmy chromozómu Y a tým následne priradiť príslušne haploskupiny. Prístroj Luminex je založený na technológii LabMAP Luminex, ktorá patrí medzi tzv. beads array. Vzorky DNA sú najprv amplifikované, inkubované s exonukleázou a následne fluorescenčne naznačené. Fluorescenčné značené produkty sú potom hybridizované s alelovo špecifickými oligonukleotidmi naviazanými na tzv. beads (5,6 µm guľôčky) a vyhodnotené prístrojom Luminex.

Populácia Fulbov, ktorá bola analyzovaná v rámci tejto štúdie, patrí medzi najrozšírenejšie africké populácie, avšak ich pôvod nie je ešte úplne vyjasnený. Svojím vzhľadom sa už na prvý pohľad líšia od ostatných susedných populácií. A tak si môžeme položiť otázku či sa bude táto fyzická odlišnosť prejavovať aj v zastúpení jednotlivých polymorfizmov chromozómu Y. V rámci tejto štúdie sme na základe SNP polymorfizmov zisťovali diverzitu chromozómu Y u 11 subsaharských subpopulácií Fulbov pochádzajúcich z Mali, Burkina Faso, Nigeru, Čadu a Kamerunu a ich vzťah k ostatným, nielen susedným populáciám Afriky. Zisťovali sme zastúpenie haploskupín chromozómu Y v jednotlivých subpopuláciách a ich podobnosť resp. odlišnosť s ostatnými africkými populáciami.

V úvodných kapitolách sú rozobraté klimatické zmeny, ktoré zasiahli Saharu od Pleistocénu až po súčasnosť a ktoré ovplyvnili osídľovanie a spôsob života populácií v danej oblasti. V úvode je veľká pozornosť venovaná populácií Fulbov, ich histórií, spôsobu života a fyzickým črtám, ktoré ich odlišujú od okolitých populácií. V ďalších kapitolách rozoberám problematiku molekulárno-genetických markerov, ktoré sa využívajú pri sledovaní histórie ľudstva. Veľká pozornosť je venovaná práve chromozómu Y, jeho štruktúre, diverzite a charakteristickým vlastnostiam, ktoré z neho robia nástroj mimoriadne vhodným na pochopenie recentných evolučných udalostí.

1 LITERÁRNY PREHL'AD

1.1 Geografická charakteristika

1.1.1 Africký kontinent

Afrika, so svojou rozlohou približne 30 370 000 km², je po Ázii druhým najväčším svetadielom. Je asi tak tri krát väčšia ako Európa a má približne 960 miliónov obyvateľov, čo predstavuje asi 14% z celkovej svetovej populácie. Rozkladá sa po oboch stranách rovníka, ktorý spôsobuje, že je Afrika svetadielom s najteplejším podnebím.

Veľká časť kontinentu je veľmi ďaleko od oceánu a to má za následok izolácie populácie od ostatných kontinentov (Hiernaux, 1975).

Podnebie Afriky je dosť variabilné. Pohybuje sa od extrémne vlhkého až po extrémne suché. Na základe podnebia môžeme Afriku rozdeliť do niekoľkých klimatických pásem a to do jedného ekvatoriálneho, ktoré sa rozprestiera v centrálnej Afrike, dvoch tropických, dvoch púštnych a dvoch stredomorských pásem. Podnebie v oblasti rovníku je charakteristické silnými zrážkami, konštantnou vysokou teplotou a vlhkosťou ovzdušia. Ekvatoriálne podnebie korešponduje z distribúciou dažďových lesov a rozprestiera sa od povodia rieky Konga pozdĺž pobrežia západnej Afriky a malej časti východného pobrežia. Tropické podnebné pásmo zaberá približne tretinu celého územia a tvoria ho rôzne typy saván. Vyznačuje sa veľmi teplým a vlhkým podnebím, avšak je o niečo suchšie ako rovníková oblasť. Táto oblasť je ovplyvnená monzúnovými vetrami a striedaním vlhkého letného a suchého zimného obdobia. Púštne podnebie je charakteristické veľkými rozdielmi medzi dennou a nočnou teplotou. Podnebie je tam veľmi suché. Pre stredomorské podnebie sú typické vlhké mierne zimy a suché horúce leta.

1.1.2 Púšť Sahara

V Afrike leží púšť Sahara, ktorá so svojou rozlohou viac než 9 miliónov kilometrov štvorcových predstavuje najväčšiu púšť sveta. Názov je odvodený z arabského slova *sahra* čo v preklade znamená púšť. Má zhruba lichobežníkový tvar s dĺžkou 4 500 – 5 500 km v smere západ-východ a šírkou 1 500 – 2 000 km od severu na juh. Rozpína sa od Červeného mora až po okraj Atlantického oceánu. Tiahne sa severne od rovníka a rozprestiera sa na území 11 štátov Afriky. Sahara zaberá veľkú časť Alžírsku, Čadu, Líbie, Egypta, Mali, Mauritánie, Maroka, Nigeru, západnej Sahary, Sudánu a Tuniska.

Sahara rozdeľuje kontinent Afriku na severnú a subsaharskú Afriku. Sahara je jedným z najhorúcejších miest na Zemi. Väčšina povrchu Sahary je kamenistá, hoci je často krát predstavovaná ako piesočná púšť.

1.2 Prehistória Sahary

Púšť Sahara nemala tú istú podobu po celý čas. V minulosti tu dochádzalo k viacerým pravidelným striedaniam obdobia sucha s obdobiami vlhka. Sahara neustále menila svoju podobu. Miesta, ktoré sú v súčasnosti púšťou boli niekedy obývané farmármi a pastiermi stáda, ktoré sa pásli na trávnatých porastoch Sahary.

Pred 50 000 rokmi bola Sahara úplne pokrytá stredozemským rastlinstvom (Hiernaux, 1975). Paleoklimatické štúdie indikujú pomerne dlhé obdobie sucha na Sahare medzi rokmi 30 až 12 ky B.P (Hassan, 1997). Na konci Pleistocénu severný prúd Afrického monzúnu po tisícoch rokov hyperaridity, priniesol množstvo zrážok do strednej oblasti Sahary (Cremaschi a di Lernia, 2001) a tým sa začalo obdobie vlhka, ktoré trvalo až do začiatku Holocénu. Približne pred 14 800 rokmi zosilňujúce letné monzóny viedli k dramatickému zmenšeniu severoafrických jazier a mokradí a postupnému vymieraniu pastvín a krovinatej krajiny (Hoelzmann et al., 1998).

Za posledných 14 000 rokov Afrika prešla najmenej 30 hlavnými klimatickými udalosťami. Jednotlivé udalosti boli prerušované niekoľkými drsnými a suchými obdobiami, ktoré podnietili množstvo reakcií ľudí žijúcich v týchto oblastiach na zmeny podnebie. Medzi tieto reakcie napríklad patrí:

- demografické miešanie, zhľukovanie alebo rozptyľovanie obyvateľstva,
- osvojovanie alebo vytváranie technologických inovácií,
- prevzatie a rozvinutie rôznych spôsobov produkcie potravín,
- evolúcia a transformácia sociálnej a politickej organizovanosti,
- podnecovanie určitých ideologických názorov a rituálnych praktík (Hassan, 2000).

Ešte okolo roku 10 000 BP bola Sahara pomerne veľmi vlhká. Rozprestierali sa v nej rozsiahle trávnaté savany a úrodné oblasti na ktorých rástli divoké obilniny ako cirok, dochan, urochlea či brachiaria (di Lernia, 1999). Jednou z významných environmentálnych zmien posledných 10 000 rokov je premena severnej Afriky zo „zelenej Sahary“ (Claussen a Gayler, 1997) na najväčšiu a najsuchšiu púšť sveta.

1.2.1 Ranný Holocén (9800 – 7400 rokov B.P)

Počas ranného a stredného Holocénu sa podnebie Afriky menilo v 10 – 100 ročných intervaloch (Grove, 1993).

Geologické dôkazy z jaskyne z Uan Afuda indikujú zvýšenie aridity na konci rannej fázy Acacus¹ (Cremaschi a di Lernia 1999).

V rannej fáze vlhkého Holocénu bola voda hlavným faktorom, ktorý ovplyvňoval spoločenské správanie. Medzi rokmi 8500 až 8200 dochádzalo k postupnému zvyšovaniu aridity Sahary, čo nútilo k čoraz väčšiemu trvalému využívaniu miest, kde je voda dostupná počas celého roku. Tieto spoločenstvá, založené na intenzívnom využívaní zdrojov, používali organizované presuny a sezónne skladovanie potravín (Barich, 2002).

Vlhké podnebie opäť začalo v druhej polovici ôsmeho tisícročia B.P., približne s koexistenciou a rozvojom pastierskej kultúry (Cremaschi, di Lernia, Garcea., 1998). Rozvinutie pastierstva v saharskej Afrike je jedinečnou udalosťou v prehistórii produkcie potravinovej ekonomiky, predovšetkým kvôli osciláciám podnebia počas Holocénu (Cremaschi a di Lernia, 2001).

1.2.2 Stredný holocén (7400 – 3500 rokov B.P)

Obdobie stredného holocénu sa vyznačuje stredne vlhkým až suchým podnebím. Oblasti, ktoré sú dnes už len výhradne púšťou, boli ešte pred 4000 rokmi obývané farmármi a pastiermi dobytky (Hiernaux, 1975). Medzi rokmi 7 000-4 000 B.P bola Sahara prevažne obývaná lovcami a pastiermi (Vernet, 2002). V centrálnej Sahare sa pastierstvo rozvinulo približne pred 6300-6000 rokmi B.P (Hassan, 2002). Stredný holocén môžeme rozdeliť na tri obdobia:

1. Ranný pastoriál (7400 – 6400 rokov B.P)

Geoarcheologické dôkazy poukazujú, že druhá polovica (7000 – 6500 B.P) ranného pastoriálu bola charakterizovaná vlhkým podnebím jednak v horských a jednak v piesočnatých oblastiach. Z toho vyplýva aj husté osídlenie obidvoch biotopov (Cremaschi et di Lernia, 1999). Okolo roku 7000 B.C. bola Sahara vo fáze maximálneho vlhka (Cavalli-Sforza et al., 1994). V tomto období dochádzalo k pravidelným presunom medzi pohoriami a nížinami, ktoré bolo ovplyvnené sezónnymi striedaniami suchých a vlhkých období (Cremaschi a di Lernia, 1999).

¹ Obdobie medzi rokmi 9800-8900 B.P, označujúce sa aj ako Epipaleolit.

2. Stredný pastoriál (6100 – 5000 B.P)

Podnebie stredného pastoriálu bolo takmer identické s podnebím, ktoré charakterizovalo predošlé obdobie. Avšak bol pozorovaný jemný posun k suchším podmienkam. Na konci 7 tisícročia B.P sa objavila krátka perióda sucha. Čo korešpondovalo s poklesom ľudského osídľovania (Cremaschi a di Lernia 1999). Okolo roku 4 000 B.P pozorujeme pokles usadlého obyvateľstva s optimálnym osídlením južných oblastí Sahary a severných častí Sahelu a nárast obyvateľstva ktoré praktizuje nomádsky spôsob života. Obyvateľstvo tohto obdobia praktizuje lov zvierat, pastierstvo a poľnohospodárstvo. Lov rýb bol ešte stále iba v určitých privilegovaných oblastiach (Vernet, 2002).

3. Neskorý pastoriál (5000 – 3500 rokov B.P)

Okolo roku 5000 B.P sa poveternostné podmienky na Sahare dramaticky zmenili. Pre toto obdobie neskorého pastoriálu bolo charakteristické suché a veľmi teplé podnebie. Sucho a vysoká teplota spôsobili drastickú premenu povrchu Sahary na úplne vyschnutý. Pre toto obdobie neskorého pastoriálu sú charakteristické jednak usadlé a jednak nomádske spoločnosti (Cremaschi a di Lernia, 1999).

1.2.3 Neskorý holocén (3500 – súčasnosť)

Obdobie sucha, ktoré nastalo okolo roku 3000 B.P, vážne zasiahlo usadlé populácie južnej Sahary, ktoré následne hľadali útočisko v južnejších oblastiach (Vernet, 2002). Krajina Sahary sa už medzi obdobím 2500 – 1600 rokmi B.P pomaly začínala podobat' na to čo vidíme v súčasnosti (Vernet, 2002). Vyschnutie Sahary bolo skompletizované už pred 2300 rokmi B.P. Počas konečného pastoriálu, púštne podmienky počas dňa viedli skupiny ľudí k rôznym typom mobility (di Lernia et al., 2002b). Približne pred 3500 – 2500 BC pastieri opustili pomaly vysychajúcu Saharu (Hiernaux, 1975).

Okolo roku 500 A.D sa objavilo na Sahare zatiaľ posledné obdobie vlhka, ktoré umožnilo obyvateľom Sahelu vrátiť sa naspäť na sever, kde sa stretli najprv s berberským a potom aj s arabským obyvateľstvom (Vernet, 2002).

1.3 Fulbovia

Fulbovia sú jednou z najrozšírenejšou etnickou skupinou v západnej a strednej Afrike, kde zohrali významnú rolu v histórii Afriky. V prvom rade sú to ich vynikajúce odborné znalosti v pastierstve a chovu dobytká. Fulbovia sa počas 1000 rokov rozšírili svoje územie cez 2 000 míľ od Senegálu až po Kamerun. Taktiež sa podieľali na rozširovaní Islamu v západnej Afrike. V súčasnosti sú ešte stále dominantnou pastierskou skupinou Sahelu² a na savanách západnej Afriky (Shillington, 2005). Fulbovia ešte aj v súčasnej dobe praktizujú transhumanciu³. Počas obdobia dažďov putujú na sever a v období sucha smerujú na juh. Potrebná transhumancia je prispôsobená aj ich veľmi jednoduchá výbava domácnosti a obmedzená remeselná výroba. Počas jedného sezónneho presunu za potravou a vodou musia uraziť vzdialenosť okolo 400 km (Černý, 2006). Počas ich disperzie na nové ekologické niky a taktiež vplyvom historických faktorov Fulbovia rozvinuli rôzne spôsoby obživy, ktoré im umožnili adaptáciu na konkrétne prírodné podmienky. Jednotlivé subpopulácie Fulbov sa od seba odlišujú svojím spôsobom života, stupňom mobility, zloženia spoločnosti, ekonomickej a politickej organizácie. V súčasnosti sú niektorí semi-nomádsky so zriedkavou migráciou, ktorá je závislá na dostupnosti vody a pastvín čo vedie k vysokej premenlivosti zloženia jednotlivých skupín a to najmä počas obdobia sucha. Iné skupiny Fulbov sú transhumantné a migrujú medzi obdobiami sucha a dažďov. A ďalšia skupina je usadlá a žije trvalo v dedinách alebo zriedkavejšie aj v mestách (Eguchi a Azarya, 1993).

Fulbovia žijú v celom sahelo-sudánskom pásme od Senegalu až po oblasť horného Nílu. Súčasnú populáciu Fulbov, ktorá žije v subsaharskej Afrike medzi Saharou a tropickými dažďovými pralesmi môže rozdeliť na usadlú populáciu Fulbov, ktorých je približne 15 miliónov a nomádsku populáciu Fulbov, ktorých počet dosahuje 13 miliónov. Nomádske kmene Fulbov žijú od východného Senegalu až po Stredoafrickú republiku a patria medzi najpočetnejšie nomádske skupiny danej oblasti. Fulbovia žijú v 17 štátoch Afriky. Hoci dnes už niektorí žijú usadlým spôsobom života, pôvodne to boli všetko nomádske pastierske kmene. Usadlé a nomádske kmene Fulbov navzájom úzko spolupracujú. Usadlé kmene sa venujú prevažne pestovaniu obilnín a to najmä cirkú. Pastierske kmene Fulbov sa zaoberajú výhradne hospodárskymi zvieratami (Černý et al., 2006). Najväčšie zastúpenie majú Fulbovia v Nigérii, kde ich žije asi 13 miliónov, čo

2 Oblasť Sahelu sa rozprestiera v severnej časti západnej, strednej a východnej Afriky na rozhraní medzi púšťou púšťou a dažďovým pralesom.

3 Transhumancia je sezónna migrácia mužov alebo aj celých rodín aj so stádami za pastvinami a vodou.

predstavuje takmer polovicu celkovej populácie Fulbov. Početné zastúpenie majú aj v Burkine Faso, Kamerune, Gambii, Guinei, Guinei-Bissau, Čade, Mali, Mauretánii, Nigeru, Senegalu, Sierra Leone a Sudánu. V menšom počte sa vyskytujú taktiež aj v Benine, Pobreží Slonoviny, Togu, Ghane, Libérii a Stredoafrickej republike.

Fulbovia sú sa od ostatných okolitých etnických skupín Afriky líšia svojimi zvykmi, kultúrou, životným štýlom či organizáciou spoločnosti. Z antropologického hľadiska sú Fulbovia značne heterogénna populácia. V porovnaní s okolitými černoškými kmeňmi, majú nápadne bledšiu pokožku, europoidné črty tváre, úzke pery, o niečo rovnejšie vlasy a podobne ako ostatné pastierske africké kmene sú veľmi vysoký a štíhli (Černý et al., 2006).

Fulfulde (fulbský jazyk) podľa etnológov patrí do severoatlantickej skupiny atlanto-konzskej vetvy Nigero-kordofánskej jazykovej rodiny. Všetci Fulbovia hovoria jazykom Fulfulde, ktorý má podľa územia množstvo dialektov(Shillington, 2005).

1.3.1 História Fulbov

Pôvod Fulbov je príčinou viacerých dohadov a úvah medzi Európskymi etnografmi a západnými antropológmi, jazykovedcami a historikmi. Na základne ústne tradície Fulbov, majú svoj pôvod v Egypte alebo na Strednom Východe. Niektorí veria, že Fulbovia sú semitského pôvodu a oddelili sa od Izraelitov. Zatiaľ čo Izraeliti z Egypta migrovali do Palestíny a Sýrie, tak predkovia Fulbov sa postupne rozširovali do západnej Afriky (Shillington, 2005).

Na základe archeologických ukazovateľoch sa pôvod nomádskej populácie Fulbov datuje do obdobia pred 5000 rokmi. Niektoré indicie nasvedčujú dokonca na neolitický pôvod Fulbov (Černý et al., 2006).

Okrem toho existujú ešte aj ďalšie teórie, ktoré vysvetľujú pôvod Fulbov:

- miešaním protoberberského obyvateľstva severnej Afriky s kmeňom Bafur, ktoré obývalo Saharu,
- sú potomkami ázijských pastierskych kmeňov, ktoré vtrhli do Afriky a postupne sa rozptýlili a osídľovali oblasť Sahelu,
- antropologické výskumy lebečných štruktúr Fulbov naznačuje veľmi silnú príbuznosť s etiopským a egyptským obyvateľstvom. Tento fakt do istej miery potvrdzuje teóriu o semitskom alebo ázijskom pôvode Fulbov.

Bez ohľadu na to, aký je ich prapôvod, je isté, že expanziu naprieč západnou Afrikou začali na území dnešného Senegalu a Mauritánie ako miešanci černošského a berberského obyvateľstva. Vytvorili niekoľko významných štátnych celkov. V 11. storočí to bolo Kráľovstvo Tekrur v dolnej časti údolia rieky Senegal, ktoré bolo dobývané Fulbmi a malo úzke kontakty so severnou Afrikou, najmä so zenagdskými Berbermi, ktorý tam priniesli Islam. V 15. storočí na strednom toku rieky Niger založili ríšu Masina a ďalšie ríše v oblasti Futa Džalonu na severu Guinei (Wolf, 1984).

Okolo roku 1450 začali Arabovia šíriť Islam do západného Sudánu a Fulbovia podobným procesom začali rozširovať Islam ale od západu a sú považovaný za najdôležitejšie etnikum, ktoré sa podieľalo na šírení Islamu v západnej Afrike. Reakciou na útlak so strany početnejších okolitých kmeňov a z cieľom získania nových pastvín začali Fulbovia v 17. a 18. storočí sériu svätých vojen. V roku 1670 dobyli oblasť Bhundu v Senegale. V roku 1673 prehrali prvú bitku v Futa Toro. V roku 1725 vyhrali dve vojny vo Futa Jalon (dnešná severná Guinea) a Futa Toro (dnešný severný Senegal). Na začiatku 19. storočia porazili kmeň Hausov a na ich území zriadili chalifát Sokoto na severe Nigérie (Wolf, 1984). Sokoto v čase svojho najväčšieho rozmachu okolo roku 1830 vytvorila lepšie organizovanú a civilizovanejšiu spoločnosť, než v ktorejkoľvek inej spoločnosti v Afrike. V roku 1820 založili chalifát Amadawa, ktorý leží na území dnešnej Nigérie a severného Kamerunu a chalifát Hamdallahi v dnešnom Mali. V roku 1880 vypukli kolonizačné spory medzi Britmi a Francúzmi. Tieto spory ukončili vzostup fulbských islamských štátov. V roku 1903 bol chalifát Sokoto dobitý Britmi.

Hoci má nomádska skupina Fulbov viac než 13 miliónov ľudí, tak ich genetická diverzita a ich vzťah k ostatným nielen subsaharským populáciám ešte nie je jasná. A preto sme sa rozhodli aspoň troškou prispieť k objasneniu ich pôvodu využitím SNP markerov chromozómu Y. V rámci tejto štúdie sme naviazali na štúdiu Černý et al (2006), ktorý analyzoval mtDNA kočovných populácií Fulbov pochádzajúcich zo štyroch rôznych lokalít. Vzorky pochádzali z oblasti Banfora a Tindangou z Burkiny Faso a z oblasti Tchiboua (Kamerun) a Bongor (Čad), ktoré budú analyzované aj v rámci tejto štúdie. Černý et al (2006) zistil, že väčšina jedincov zdieľa subsaharskú haploskupinu L. Avšak u 8,1% jedincov boli zistené haploskupiny, ktoré majú západoeurázijský pôvod a ktoré sa vyskytujú aj v severnej Afrike. Najčastejšie sa vyskytujúcimi haploskupinami mtDNA sú haploskupiny L3b a L3d, ktoré majú svoj pôvod v západnej Afrike. Ďalšou často vyskytujúcou haploskupinou, ktorá bola zistená u Fulbov je L1b, ktorá má taktiež pôvod v západnej Afrike. Génová diverzita zistená prostredníctvom mtDNA sa pohybuje v rozpätí

0,893-0,953 a definuje populáciu Fulbov ako značne homogénnu. Analýza mtDNA štyroch subpopulácií Fulbov z oblasti Bongor, Tcheboua, Tindangou a Banfora v štúdií. Černý et al (2006) preukázal jasný a tesný vzťah všetkých štyroch subpopulácií Fulbov.

V rámci tejto štúdie, ktorá sa zaoberá analýzou SNP polymorfizmov chromozómu Y kočovnej populácie Fulbov sme vychádzali s nasledovných pracovných hypotéz:

V dôsledku toho, že väčšina populácie praktizuje patrilokalitu, tak analýzou chromozómu Y vo vyššej frekvencii zistíme výskyt pôvodných haploskupín, ktoré sa podieľali na vytváraní genofondu populácie Fulbov. Analýzy mtDNA populácie Fulbov, ktorá bola prevedená Černým et al (2006) detegovala v populácií Fulbov v prevažnej väčšine iba mtDNA haploskupiny, ktoré majú pôvod v západnej Afrike.

Varianty chromozómu Y sa v porovnaní s varianty mtDNA vyskytujú oveľa viac viazané k určitej geografickej oblasti. A na základe toho potvrdíme alebo vyvrátime teórie o pôvode Fulbov, ktoré sú uvedené v úvodnej kapitole.

Ak by populácia Fulbov mala svoj pôvod v severnej Afrike, tak analýzou chromozómu Y zistíme výskyt haploskupín, ktoré sú typické práve pre severnú Afriku. Arredi et al (2004) zistila, že v severnej Afrike sa medzi najčastejšie vyskytujúce sa haploskupiny patrí haploskupina E1b1b1b, ktorá je definovaná polymorfizmom M81 a haploskupina J, ktorú definuje polymorfizmus M304. Haploskupina J nebola detegovaná v ostatných populáciách severnej a strednej Afriky.

Pokiaľ by Fulbovia mali svoj pôvod vo východnej Afrike ako tomu nasvedčujú aj antropologické výskumy lebečných štruktúr, tak analýzou SNPs chromozómu Y zistíme vo vysokej frekvencii výskyt haploskupín, ktoré vznikli práve vo východnej Afrike. Medzi haploskupiny, ktoré majú svoj pôvod vo východnej Afriky patria paraskupina E1b1*(x E1b1a, E1b1b1), ktorá je definovaná polymorfizmom P2*, paraskupina E1b1b1*(x E1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c), ktorú definuje polymorfizmus M35* a haploskupina E1b1b1a, ktorá je definovaná polymorfizmom M78. Tieto východoafrické haploskupiny sa v ostatných populáciách strednej a západnej Afriky nevyskytujú alebo sa vyskytujú len vo veľmi nízkej frekvencii.

A ak by sa ich pôvod odvodzoval dokonca až od ázijských pastierov, ktorý následne vtrhli do Afriky, kde postupne osídľovali oblasť Sahary, tak analýzou chromozómu Y zistíme výskyt haploskupín, ktoré sa vo vysokej frekvencii vyskytujú hlavne v Ázii. V Ázii medzi najčastejšie sa vyskytujúce haploskupiny patria haploskupina R, J, C, D, N a O.

V subsaharskej Afrike, v ktorej v súčasnosti žije aj populácia Fulbov, je pomerne dobre rozšírená paraskupina E1b1a*(x E1b1a1), ktorá je definovaná polymorfizmom M2*.

1.4 Y Chromozóm

1.4.1 Štruktúra Y chromozómu

Chromozóm Y patrí medzi pohlavné chromozómy. Chromozóm Y sa spolu s omnoho väčším chromozómom X podieľa na determinácii pohlavia u človeka. Pohlavné chromozómy X a Y sa vyvinuli s autozómom približne pred 200 – 300 miliónmi rokov. Z morfológického hľadiska je chromozóm Y malým akrocentrickým chromozómom. Z genetického hľadiska obsahuje niektoré DNA sekvencie, ktoré sú typické iba pre tento chromozóm a ktoré sú nezbytné pre správnu tvorbu spermií.

Ľudský chromozóm Y zo svojimi 63 miliónmi básových párov je tretím najmenším chromozómom (Skaletsky et al., 2003). Svojím rozsahom predstavuje 2 – 3 % celého haploidného genómu človeka (Quintana-Murci a Fellous, 2001). Z celkovej dĺžky chromozómu Y sa 95% podieľa na diferenciácii mužského pohlavia. Táto oblasť sa označuje ako mužská špecifická oblasť chromozómu Y (MSY). MSY je mozaikou heterochromatickej sekvencie a troch euchromatických sekvencií. V tejto oblasti, počas meiózy, nedochádza ku crossing-overu medzi X a Y chromozómom teda je to nerekombinujúca oblasť chromozómu Y a označuje sa aj ako NRY (Skaletsky et al., 2003). Oveľa častejšie sa v literatúre stretávame s označením MSY než s označením NRY.

Rôznymi cytogenetickými štúdiami boli na chromozóme Y identifikované jednotlivé regióny, ktoré sa označujú ako pseudoautozomálna, euchromatická a heterochromatická oblasť.

Pseudoautozomálna oblasť (PAR) je rozdelená do dvoch regiónov PAR1 a PAR2. PAR1 s rozsahom 2 600 kb sa nachádza v terminálnej oblasti krátkeho ramena chromozómu. PAR2 s rozsahom 320 kb je lokalizovaná na konci dlhého ramena chromozómu Y (Quintana-Murci a Fellous, 2001). Pseudoautozomálne oblasti chromozómu Y sa počas meiotického delenia párujú so pseudoautozomálnymi oblasťami chromozómu X a dochádza medzi nimi aj ku crossing-overu.

Euchromatická oblasť so svojím rozsahom 23 Mb sa rozprestiera distálne od PAR1 oblasti a je zložená z paracentromerickej oblasti krátkeho (8 Mb) a dlhého ramena (14,5 Mb) a centroméry (Quintana-Murci a Fellous, 2001). V euchromatickej oblasti je lokalizovaných 156 transkripčných jednotiek, z ktorých je 68 proteín kódujúcich jednotiek (Skaletsky et al., 2003). Euchromatická oblasť je tvorená tromi druhmi sekvencií a to X-transponovanými, X-degenerovanými a amplikonmi.

X-transponované sekvencie vykazujú 99 % identitu s chromozómom Xq21. X-transponované sekvencie sa nezúčastňujú X-Y crossing-overu počas meiózy (Butler, 2005) a sú výsledkom masívnej transpozície chromozómu X na Y, ktorá nastala pred 3-4 miliónmi rokmi (Mumm et al., 1997; Schwartz et al., 1998) po divergencií ľudskej a šimpanzej línie.

X-degenerované sekvencie (8,6 Mb) sa vyskytujú v 8 blokoch na oboch ramenách chromozómu Y (Butler, 2005). Jedno kópiové MSY gény a pseudogény ukazujú 60-96% nukleotidovú identitu s X homológom. Sú prežívajúcim reliktom starovekých autozómov, s ktorých sa vyvinuli moderné pohlavné chromozómy X a Y (Skaletsky et al., 2003).

Treťou triedou euchromatických sekvencií sú amplikony, ktoré zaberajú až 30 % oblasti euchromatínu. Sekvenčné páry ukazujú viac než 99,9% identitu, ktorá je udržiavaná prostredníctvom génových konverzií (Skaletsky et al., 2003). Amplikony sa nachádzajú v siedmych segmentoch, ktoré sú rozptýlené medzi dlhým euchromatickým ramienko a krátkym proximálnym ramienkom (Butler 2005). Amplikonové sekvencie vykazujú najväčšiu hustotu kódujúcich a nekódujúcich génov spomedzi všetkých troch tried MSY euchromatínu.

Heterochromatická oblasť chromozómu Y pozostáva z troch heterochromatínových blokov. Prvá heterochromatínová sekvencia sa nachádza v oblasti centroméry, druhý a oveľa väčší heterochromatický blok sa rozprestiera na distálnom konci dlhého ramena. Tretí blok heterochromatínu prerušuje euchromatínové sekvencie na Yq (Skaletsky et al., 2003). Jednotliví muži sa líšia dĺžkovým polymorfizmom heterochromatínu.

1.4.2 Gény chromozómu Y

V porovnaní s ostatnými ľudskými chromozómami má chromozóm Y len veľmi málo génov, s ktorých sa väčšina podieľa na spermatogenéze. Chromozóm Y môže byť výsledkom degenerácie Y génov počas evolúcie (Graves, 1995). Pohlavné chromozómy X a Y cicavcov pochádzajú z ancestrálnych autozómov. Väčšina funkčných génov bola zachytená vznikajúcim X chromozómom.

NRY gény môžeme rozdeliť do dvoch kategórií. Do prvej kategórie patria gény, ktoré sú všadeprítomné exprimované, majú svojho X homológa, na chromozóme Y sa vyskytujú iba v jednej kópii. Druhá kategória zahŕňa gény, ktoré sú špecificky exprimované v testes, existujú vo viacerých kópiách a kódujú proteíny s vysoko špecializovanou funkciou (Lahn a Page, 1997).

1.4.3 Špecifické črty chromozómu Y

Chromozóm Y sa vyskytuje len v mužských bunkách a dedí sa výhradne po mužskej línii z otca na syna. Kombinácie alel sú predávané z jednej generácie do druhej v intaktnej forme. K zmene alel dochádza len prostredníctvom mutácií. Mutácia, ku ktorej dôjde v jednej generácii, sa prenáša aj na ďalšie generácie.

Iba dva segmenty tzv. pseudoautozomálne oblasti chromozómu, ktoré predstavujú menej než 3 Mb z približne 60 Mb veľkého chromozómu Y podliehajú rekombináciám (Skaletsky et al., 2003). Zvyšná časť chromozómu sa označuje ako nerekombinujúca oblasť (NRY). Táto nerekombinujúca oblasť je špecifická iba pre mužov (MSY) a obsahuje gény, ktoré sú potrebné pre tvorbu spermií.

V dôsledku toho, že je chromozóm Y haploidný a špecifický pre mužov, tak jeho efektívna populačná veľkosť je štvrtinová vzhľadom ku ktorémukoľvek autozómu a tretinová v porovnaní s chromozómom X. Efektívna veľkosť chromozómu Y je podobná efektívnej veľkosti mtDNA (Joblings a Tyler-Smith, 2003).

Y chromozóm je v porovnaní s ostatnými chromozómami v oveľa viac citlivejší na pôsobenie genetického driftu (Jorde et al., 2000; Underhill et al., 2001). Pôsobením genetického driftu môže dôjsť k náhlym zmenám frekvencií jednotlivých haplotypov vo veľmi krátkom čase.

Polymorfizmy chromozómu Y sa veľmi často vyskytujú viazané k určitej geografickej oblasti. Približne 70% modernej spoločnosti praktizuje patrilokalitu (Jobling a Tyler-Smith, 2003). Čo znamená, že sa manželka oveľa častejšie sťahuje za svojím manželom. Následkom toho, že väčšina mužov žije v mieste svojho narodenia spôsobuje, že varianty chromozómu Y majú sklon ku lokálnemu rozšíreniu častejšie než varianty mtDNA alebo autozómov (Seielstad et al., 1998).

1.4.4 Y chromozomálny strom a nomenklatúra haploskupín

Termín haploskupina a haplotyp má viacero používaných definícií. Na prednáškach z evolučnej genetiky sa stretávame s definíciou haploskupiny ako klastrom haplotypov, ktoré zdieľajú spoločné variability a majú fylogeneticky spoločného predka. A haplotyp je definovaný ako sekvencia s jedinečnou kombináciou znakov, ktoré sa predávajú z jednej generácie na ďalšiu generáciu. Jediným nástrojom, ktorý je schopný diverzifikovať jednotlivé haplotypy sú mutácie. Pochopenie mutačnej dynamiky je veľmi dôležité na pochopenie pôvodu diverzity haplotypov. Poznanie mutačnej miery a mutačného

procesu jednotlivých markerov je základom pre evolučnú interpretáciu diverzity a pre pochopenie genetických chorôb. Mutácie chromozómu Y sú výsledkom výhradne intraalelického procesu (Jobling a Tyler-Smith, 2003). De Knijff (2000) používa termín haploskupina pre všetky línie, ktoré sú definované prostredníctvom binárnych polymorfizmov. Termín haplotyp používa na pomenovanie všetkých sublínií, ktoré sú definované prostredníctvom STR.

YCC (Y chromosome consortium) je medzinárodná skupina vedcov vedená Michaelom Hammerom z Arizonskej univerzity, Petrom Underhillom zo Stanfordskej univerzity, Markom Joblingom z Leicesterskej univerzity a Chrisom Tyler-Smithom, ktorý bol v roku 2002 na Oxfordskej univerzite. Ich spoločne publikovaná štúdia s názvom *„A nomenclature system for the tree of human Y chromosomal binary haplogroups“* umožnila jednoduché porozumenie siedmich predtým publikovaných metód pre opísanie informácií s rovnakých SNP markerov. Prvú metódou a haploskupinový strom uverejnil v roku 1999 Su a jeho kolektív. Jeho fylogenetický strom bol zostavený na základe jednoduchých pravidiel a vetvenie stromu bolo taktiež prispôbené jednoduchšej topológii. Jednotlivé haplotypy označuje písmenom „H“ a arabským číslom. Haplotypy H1 a H2 sú relatívne staré a objavujú sa u afrických aj neafrických populáciách. H5 a všetky jej deriváty sú odvodené od mutácie v polymorfizmu M9. H15 a H17 sú haplotypy špecifické pre Američanov, Indiánov a Oceániu. Haplotyp H14 sa vo vysokej frekvencii vyskytuje v Európe ale taktiež sa vyskytuje aj v Oceánii, Ázii a Amerike. Haplotypy H6 – H13 sú zásadne ázijsky špecifickými haplotypmi.

V roku 2000 boli publikované ďalšie haploskupinové stromy. Autormi týchto stromov boli Semino s kolektívom, Underhill so svojím tímom a Tyler-Smith spolu s Joblingom. Karafet s kolegami, Semino so svojimi kolegami a Capelli so svojimi spolupracovníkmi publikovali svoje haploskupinové stromy chromozómu Y v roku 2001.

Veľmi často využívaním fylogenetickým stromom chromozómu Y bol strom, ktorý publikoval Underhill et al v roku 2000. Celý strom bol rozdelený do 10 hlavných vetiev, ktoré označil rímskymi číslami I – X. Do vetvy I zaradil všetky haplotypy, ktoré zdieľajú polymorfizmus M91. Haploskupiny druhej vetvy zdieľajú polymorfizmus M60 a tretej vetvy polymorfizmus M96. Haploskupiny tretej vetvy sú rozšírené najmä v Afrike a v haploskupinovom strome, ktorý bol publikoval YCC v roku 2002 je táto haploskupina III označená ako haploskupina E. Haploskupina IV je odvodená od polymorfizmu M174 a vyskytuje sa hlavne v Japonsku. Haploskupina V je odvodená od polymorfizmu M130. Haploskupina VI zdieľa polymorfizmus M89 a haploskupina VII polymorfizmus M175.

Do haploskupiny VIII sú zaradené všetky haplotypy, ktoré sú odvodené od polymorfizmu M9. Haploskupina IX zdieľa polymorfizmus M173 a súčasný haploskupinový strom ju označuje ako haploskupinu R. Haploskupina X je definovaná polymorfizmom M45. Tento haploskupinový strom vo svojich štúdiách používal aj Cruciani.

V roku 2000 publikoval svoj Y chromozomálny strom aj Semino, ktorí hlavné vetvy stromu označuje písmenami „Eu“ a arabskými číslicami.

Prehľad ďalších publikovaných stromov s príkladmi označovania jednotlivých haploskupín je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1. Prehľad ďalších publikovaných Y fylogenetických stromov chromozómu Y,
upravené podľa YCC (2002)

Označenie haploskupiny	Odvođená alela v polymorfizme	Pôvodná alela v polymorfizme	Označenie na základe YCC (2002)
Tyler-Smith a Jobling (2000)			
3	SRY _{10831b}		R1a
8	M2		E3a
9	12f2a		J
21	SRY ₄₀₆₄	P2	E*(xE3)
25	P2	M2	E3*(xE3a)
27	MEH1		A2
35	M52		H
Hammer et al (2001)			
1D	SRY _{10831b}		R1a
1L	P25		R1b
2	P3		A2
3A	SRY ₄₀₆₄	P2	E*(xE3)
4	P2	P1	E3*(xE3a)
5	P1		E3a
Med	12f2a		J
Karafet et al (2001)			
4	P28	SRY _{10831a}	A2b
13	SRY ₄₀₆₄	P2, P1	E*(xE3)
14	P2	P1	E3*(xE3a)
15	P1		E3a
24	M172		J2
44	P25		R1b
45	SRY _{10831b}		R1a
Capelli et al (2001)			
A		SRY _{10831a}	Y*(xBR)
B	SRY _{10831a}	RPS4Y, M9	BR*(xC,K)
C	RPS4Y ₇₁₁		C
D	92R7		P

YCC v roku 2002 zostavilo komplexný a jednotný haploskupinový strom pre haploskupiny chromozómu Y. Haploskupinový strom chromozómu Y, zostavený YCC v roku 2002 je uvedený v Prílohe 4. Strom bol zostavený genotypovaním väčšiny známych polymorfizmov NRY chromozómu Y (YCC, 2002). Fylogenetický strom chromozómu Y, ktorý zostavilo YCC v roku 2002 pozostával so 153 haploskupín, ktoré boli definované 245 mutačnými udalosťami. O rok neskôr Jobling a Tyler-Smith publikovali modifikovanú verziu Y chromozomového stromu haploskupín.

YCC predložilo dva komplementárne nomenklatúry pre haploskupiny chromozómu Y. Prvá nomenklatúra je hierarchická a umožňuje jednoznačne pomenovať jednotlivé klady na rôznych stupňoch. YCC pridelila veľké písmena hlavným vetvám stromu, počínajúc písmenom A a pokračujúc abecedou po písmeno R (YCC, 2002; Karafet et al., 2008). V súčasnosti sa Y chromozomálny strom haploskupín rozšíril ešte o novo objavené haploskupiny S a T (Karafet et al., 2008). Subklady každej hlavnej haploskupiny sú označované alfa numerickým systémom (YCC, 2002). Napríklad haploskupina A sa ďalej vetví na haploskupiny A1, A2, A3 a paraskupinu A*. Ďalšie vetvenie haploskupín sa pomenováva rovnakým spôsobom, akurát sa využívajú malé písmena abecedy (YCC, 2002). Napríklad haploskupina R1 sa vetví na R1a a R1b.

Línie, ktoré nie sú definované na základe odvodenej alely sa označujú ako paraskupiny. Paraskupiny sú odlišené od haploskupín použitím symbolu *, ktorý znamená že chromozómy patria do určitej klady ale nie do konkrétnej haploskupiny (YCC, 2002). Napríklad: Paraskupina E* patrí do klady E, avšak nespadá ani do jednej z haploskupín E1a, E2 alebo E1b1.

Alternatívnym spôsobom môžu byť haploskupiny pomenované na základe mutácií, ktoré definovali jednotlivé línie (YCC, 2002). Napríklad haploskupina E1 sa označuje ako E-M33.

1.4.5 Vytváranie Y chromozómovej diverzity

Diverzitu chromozómu Y ovplyvňuje niekoľko faktorov. Jednotlivé populácie sa okrem iného líšia aj svojou genetickou diverzitou. Diverzitu ovplyvňuje veľkosť populácie, ich spôsob života a taktiež aj sociálne faktory.

V dôsledku toho, že väčšina spoločností praktizuje patrilokalitu spôsobuje, že diverzita chromozómu Y je oveľa nižšia ako diverzita mtDNA (Salem et al., 1996).

Medzi faktory, ktoré významne ovplyvňujú diverzitu patria veľkosť populácie a jej

mobilita. Ak je populácia veľká a žije usadlým spôsobom života, tak zmeny vo frekvencii haploskupín v dôsledku genetického driftu sú pomalé a tok génu vedie ku klinálnej variabilite. Veľké nehostinné regióny v strednej a severnej Ázii či Ruska s nízkou hustotou zaľudnenia taktiež preukazujú zmenu diverzity chromozómu Y oproti husto zaľudneným oblastiam (Jobling a Tyler-Smith, 2003). Je to dané malou efektívnou veľkosťou mužskej populácie, na ktorú veľkou silou pôsobí genetický drift. Diverzita chromozómu Y môže byť aj v rámci jednej populácie vysoko štruktúrovaná na základe sociálnych skupín. Takýmto prípadom je India, kde je populácia štruktúrovaná na základe sociálnych faktorov do jednotlivých kást, čo ovplyvňuje množstvo aspektov života vrátane manželských partnerov. A tak dochádza k tomu, že je jedna veľká populácia rozdelená do niekoľkých endogamných subpopulácií (Jobling a Tyler-Smith, 2003).

Množstvo aspektov modernej Y chromozómovej diverzity odráža nasledujúce udalosti. Dôležitou udalosťou bola zmena podnebia, ktorá kulminovala v poslednom glaciálnom maximu (~18 – 22 kya). Moderní ľudia prežili ľadovú dobu vo rôznych častiach sveta v refúgiách. Teplé stabilné podnebie pred 10 kya, počas Holocénu, umožnilo adaptáciu na poľnohospodársky spôsob života, ktorý bol doprevádzaný demografickou expanziou (Jobling a Tyler-Smith, 2003).

V Afrike sú dôsledky Paleolitických udalostí na Y chromozómovú diverzitu bezpredmetné, pretože recentná a významná expanzia haploskupiny E je spájaná v súvislosti s Bantuskou expanziou zo západnej Afriky, ktorá začala približne pred 2,7 kya (Jobling a Tyler-Smith, 2003). To je aj jedným z dôvodov, prečo haploskupiny A a B sú v súčasnosti vzácne a prečo väčšina Afričanov zdieľa práve haploskupinu E. Okrem toho sa vyskytli ešte ďalšie významne a dôležité migrácie do severnej Afriky. Taktiež je dokázaná najmenej jedna prehistorická migrácia z Ázie späť do subsaharskej Afriky. Dôkazom tejto spätnej migrácie do Afriky je výskyt haploskupiny R v severnom Kamerune. Spätú migráciu z Ázie do subsaharskej Afriky potvrdzuje štúdia Crucianiho et al (2002), ktorý analyzoval 77 bialelických miest MSY oblasti Y chromozómu u 608 mužských vzoriek zozbieraných z 22 Afrických populácií, ktoré reprezentujú všetky hlavné populácie Afriky. detegoval 37 rôznych binárnych haploskupín. 73% z celkového počtu vzoriek patrí do typickej africkej haploskupiny E, ktorá je rozšírená po celom kontinente. Do špecificky africkej haploskupiny A patrí 7% a haploskupiny B podľa štúdie Crucianiho a jeho kolegov patrí 6 % skúmaných populácií. Haploskupina R, ktorá je typickou eurázijskou haploskupinou, je rozšírená v prevažne v severnom Kamerune, kde jej frekvencia výskytu dosahuje až 40%.

Ďalšou významnou a veľmi dôležitou štúdiou, ktorá sa zaoberala DNA variabilitou chromozómu Y bola práca Arrediho et al (2004), ktorý haplotypizoval 275 vzoriek DNA piatich afrických populácií pochádzajúcich z Alžírsku, Tuniska a Egypta. Identifikovali 23 rôznych haploskupín. Výsledkom bolo zistenie, že diverzita chromozómu Y v severnej Afrike je geograficky štruktúrovaná a zapadá do vzorca očakávaného podľa izolačne vzdialenostného modelu. Haploskupiny, ktoré prevládajú v severnej Afrike sú značne odlišné od susedných regiónov: Európy a subsaharskej Afriky. V severnej Afrike medzi najčastejšie sa vyskytujúce haploskupiny patrí haploskupina J a haploskupina E1b1b1b. Severná Afrika sa taktiež vyznačuje silnou geografickou variabilitou štruktúry chromozómu Y medzi jednotlivými oblasťami. Štatistickými testami bola v severnej Afrike zistená vysoká a signifikantná korelácia medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou. Y-chromozomálna genetická štruktúra pozorovaná v severnej Afrike je výsledkom včasnej expanzie pastierov (Arredi et al., 2004).

Štúdium diverzity chromozómu Y sa využíva pri štúdiu evolúcie, genealogickom pátraní, forennej praxe a medicínskych výskumoch spojených s výskumom fenotypov jednotlivých ochorení.

1.5 Molekulárne markery v antropologických genetických štúdiách

V roku 1973 bol publikovaný článok s názvom „*The use of genetic markers of the blood in the study of the evolution of human population*“, ktorý sa pokúsil zlúčiť pole antropologickej genetiky (Crawford, 1973). Tento článok definuje genetické markery ako „jednotlivo segregujúce, genetický charakteristické, ktoré môžu byť použité na charakterizovanie populácií podľa ich prítomností, absencie alebo vysokej frekvencie v niektorých populáciách a nízkej frekvencie v iných populáciách“ (Crawford 1973: 38).

Jednotlivé typy markerov nám umožňujú sledovanie variability medzi populáciami. Populačná variabilita sa na začiatku sledovala prostredníctvom tzv. klasických markerov. Medzi klasické markery patria napríklad krvné skupiny, proteíny a ich rôzne izoformy. Až v neskoršej dobe sa začali v čoraz väčšej miere využívať molekulárno-genetické markery. Postupne s rozvíjajúcimi sa metódami analýzy DNA sa začali používať mikrosatelitné repetície (STR), autozomálne Alu repetície a jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), ktoré boli použité aj vrámci tejto štúdie. Postupom času sa okrem analýz jadrovej DNA prešlo k výskumom mtDNA, ktorá sleduje výlučne maternálnu

dedičnosť. V druhej polovici 90. rokov minulého storočia sa do popredia výskumov dostala aj nerekombinujúca časť Y chromozómu, ktorá zase umožňuje sledovanie paternálnej línie. Využitie jednotlivých molekulárnych markerov v antropologických genetických štúdiách má svoje určité výhody ale aj nevýhody. Charakteristika jednotlivých molekulárnych markerov a ich využitie je zhrnuté v nasledujúcich podkapitolách.

1.5.1 Autozomálne markery

V somatickej bunke človeka sa nachádza 22 párov autozómov, ktoré zahŕňajú prevažnú časť genetickej informácie človeka.

Autozomálne markery sú na potomkov prenášané od obidvoch rodičov čím sa podstatne líšia od paternálneho prenosu Y chromozómových markerov či maternálneho prenosu mtDNA markerov. Poskytuje nám informácie o oboch pohlaviach. Štúdie, ktoré využívajú autozomálne markery majú určitú výhodu nad štúdiami, ktoré využívajú Y chromozómové alebo mtDNA markery. Vzorky nám poskytujú veľký genetický fond a sú viac reprezentatívne pre populáciu. Avšak na rozdiel od nerekombinujúcich oblasti chromozómu Y a mtDNA, tak alely na rozličných lokusoch autozomálnych chromozómov môžu podliehať rekombinácii (Rubicz et al., 2007).

Recentné štúdie variability ľudskej DNA boli sledované v niektorých kódujúcich sekvenciách ako napríklad gény pre β -globulín (Harding et al., 1997) alebo lipoproteínovú lipázu (Clark et al., 1998).

Na autozomálnych chromozómoch boli avšak sledované aj niektoré nekódujúce sekvencie s obmedzenou rekombináciou. Štúdia Zhaa et al (2000) analyzovala 10 kb veľkú nekódujúcu oblasť chromozómu 22. Ďalším sledovaným úsekom bola 10 kb oblasť chromozómu 1. Táto oblasť obsahuje iba štyri krátke exóny a zvyšok tvoria intróny (Yu et al., 2001).

Informácie z nekódujúcich sekvencií DNA nám oveľa presnejšie odrážajú ľudskú históriu. Mutácie, ktoré sa vyskytujú v nekódujúcich oblastiach nie sú priamym predmetom prírodnej selekcie.

Jedným z príkladov autozomálneho kódovaného markeru, ktorý môže byť využitý na sledovanie ľudskej fylogeniezy je ľudský $\alpha 2$ gén pre kolagén (COL1A2)⁴, ktorý bol použitý Mitchellom et al (1999), ktorý sledoval celosvetovú distribúciu 38 bp deléciu

4 COL1A2 je gén, ktorý kóduje peptid pre kolagén 1, ktorý je zložkou kože, kosti, krvných ciev, ligamentov a dentínu.

v géne medzi jednotlivým populáciami. Rovnako ako ostatné štúdie molekulárnych markerov dospel k záveru, že moderný *Homo Sapiens* má svoj pôvod v subsaharskej Afrike a postupne sa rozšíril do celého sveta.. Delécia kolagénu sa u neafrických populácií vyskytovala vo vysokej frekvencii, zatiaľ čo u subsaharskej populácií kompletne absentovala (Mitchell et al., 1999). Tento výsledok indikuje, že marker musel vzniknúť krátko potom čo moderný človek opustil Afriku, ale predtým než sa stihol rozšíriť do celého sveta.

1.5.2 SNP polymorfizmy

Ak budeme analyzovať dva náhodne vybrané ľudské genómy, tak zistíme, že 99,9% DNA sekvencie je identická. Zvyšných 0,1% pripadá na určité odlišnosti alebo variácie. Tieto varianty sa označujú ako polymorfizmy. Najjednoduchšou formou sú substitúcie jedného nukleotidu, ktoré sa označujú ako SNPs (Shastri, 2002). SNP sú mutácie jednej bázy (A, C, G alebo T) za inú bázu. Substitúcia spôsobí vytvorenie dvoch verzií DNA sekvencie. Jedna sa označuje ako pôvodná (ancestrálna) a druhá je odvodená (recentná).

SNP polymorfizmy sú významným nástrojom forenzných vedných disciplín. Prvým dôvodom ich využitia je, že sa v porovnaní s ostatnými druhmi DNA polymorfizmov, vyskytujú vo veľmi vysokej frekvencii. Druhý dôvod spočíva v ich jednoduchosti. SNPs môžeme analyzovať z malého množstva DNA. Tretím dôvodom je ich malá mutačná rýchlosť (Brion et al., 2004). Takže je málo pravdepodobné aby došlo k spätnej mutácii, alebo by v danom lókuse došlo k mutácii dvakrát. V dôsledku malej mutačnej rýchlosti sú niekedy označované aj ako Unique Event Polymorphisms (UEPs). To znamená, že každá mutácia sa v histórii človeka objaví iba raz (Turner, 2008). Mutačná rýchlosť SNP je približne $2,3 \times 10^{-8}$ (Nachman a Crowell, 2000). Tieto jednoduché bazové substitúcie sú výsledkom aktivity mutagénov ako je radiačné žiarenie alebo chybného zaradenia nukleotidu počas replikácie DNA. Dochádza tu buď k tranzícií alebo transverzií. Tranzícia je zámena purínu za iný purín. Pri transverzií dochádza k zámene purínu za pyrimidín alebo pyrimidínu za purín. Na základe určitých odhadov 50 % mutácií sa vyskytuje v nekódujúcich sekvenciách, 25 % mutácií vedie k aminokyselinovej zámene a 25 % mutácií je tichých (Cargill et al., 1999).

SNP sú vhodné pre genetické štúdie, pretože sú roztrúsené po celom ľudskom genóme a sú stabilné. V nekódujúcich oblastiach sa vyskytujú s frekvenciou 1:1000, v kódujúcich oblastiach je ich výskyt 1:1200 (Bruchová et al., 2005). Využitie SNPs je

rozmanité. Uplatňujú sa pri analýzach v mnohých vedných odboroch. V medicíne sa využívajú ako genetické markery pri mapovaní génov, ktoré sú spôsobujú rôzne patológie, napr. hypertenzia, diabetes mellitus, schizofrénia a iné. V evolučnej biológii majú nepostrádateľný význam pri porovnávaní a posudzovaní odlišností a zhody ľudského genómu s genómom ľudoopov.

V súčasnosti existuje viac než 20 odlišných metód, ktoré nám umožňujú genotypizáciu SNPs (Tsuchihashi a Dracopoli, 2002).

Najjednoduchšie môžeme SNPs identifikovať pomocou RFLP analýz. Pri RFLP analýzach je cieľová DNA amplifikovaná pomocou PCR a špecificky rozštiepená využitím reštrikčných enzýmov. Výsledok pôsobenia reštriktáz je vyhodnotený gélovou elektroforézou. Prehľad niekoľkých ďalších metód je uvedený v tabuľ 2. My sme v tejto štúdií na analýzu SNP polymorfizmov využili technológiu LabMAP Luminex, ktorá je podrobnejšie opísaná v kapitole 4.4.

Tab. 2. Zhodnotenie vybraných skríningových metód analýzy SNPs (Shastry, 2002).

Metóda	Dĺžka fragmentov (bp)	Výhoda	Nevýhoda	Úspešnosť (%)
Single-strand conformational polymorphism (SSCP)	~300	žiadne drahé vybavenie	malé fragmenty, teplotná variabilita	80
Heteroduplex	300-600	žiadne drahé vybavenie	determinácia podmienok	80
Denaturačná gradientová gélová elektroforéza	100-1000	jednoduché, dlhé a krátke fragmenty	potrebný gradientový gél, mutácie v GC regiónoch nemusia byť detekované	100 bez GC párov
Enzymatická mismatch detekcia	300-1000	dlhé a krátke fragmenty	identifikácia všetkých typov mutácií	100
RNAzové štiepenie	1,6 kb	dlhé fragmenty, rýchlo	potrebný špeciálny kit	100
Chemické štiepenie	1-2 kb	veľmi dlhé fragmenty	viac kroková, nebezpečné chemikálie, intenzívna laboratórna práca	100
Sekvenovanie	500	veľmi rýchla a jednoduchá	intenzívna laboratórna práca	100

1.5.3 Tandemové repetície

Tandemové repetície môžeme podľa veľkosti a počtu opakujúceho sa motívu rozdeliť do niekoľkých skupín na:

Krátke tandemové opakovania (STRs), ktoré sa označujú aj ako mikrosatelity a medzi ktoré sa zaraďujú krátke opakujúce sa jednotky v rozsahu 1-6 báзовých párov

s celkovým opakujúcim sa motívom menej než 350 bp (Guarino et al., 1999). STR sú nástrojom na identifikáciu jedincov (Gill et al., 1994), mapovanie chromozómov a väzobné analýzy (Hearn et al., 1992). STR sa taktiež využívajú pri štúdiách molekulárnej evolúcie (Meyer et al., 1995) a v populačnej genetike (Bowcock et al., 1994). V porovnaní s SNP sa tandemovo opakujúce sa sekvencie DNA vyvíjajú rýchlejšie. STRs sa vyskytujú bežne v celom ľudskom genóme. Vyskytujú sa približne každých 6-10 kb. Mutačná rýchlosť STR je 10^{-4} - 10^{-3} na lokus a generáciu. A preto sú vhodnými markermi na skúmanie recentnej histórie ľudstva, ako napríklad recentnú separáciu jednotlivých skupín ľudí (Rubicz et al., 2007). STR sa vďaka svojej vysokej mutabilite využívajú na datovanie jednotlivých haploskupín.

Variabilný počet tandemových opakovaní (VNTRs), ktoré sa taktiež označujú aj ako minisatelity predstavujú inú skupinu repetitívnych DNA sekvencií pozostávajúcich z minisatelitov alebo VNTR polymorfizmov. Opakujúci sa motív je zložený z 10-100 báзовých párov z celkovou dĺžkou viac 1000 bp. Zvyčajne sú bohaté na GC. VNTRs mutujú oveľa rýchlejšie než STRs. Mutačná rýchlosť je približne 10^{-2} - 10^{-1} na lokus a generáciu. VNTRs vykazujú veľké množstvo variácií medzi jednotlivcami a preto sa využívajú vo forenzných štúdiách (Rubicz et al., 2007). VNTRs boli úspešne použité pri antropologických genetických výskumoch pri skúmaní Sibírskeho pôvodu pôvodnej Americkej populácie (McComb et al., 1995). VNTRs markery sa môžu použiť pri rozlišovaní jednotlivých populácií, zisťovanie blízkych príbuzenských vzťahov a pri skúmaní recentných udalostí ako napríklad migrácie ľudí (Rubicz et al., 2007).

Telomerické arrays a satelity sú opakujúce sa polymorfizmy, ktoré nie sú veľmi často používané v antropologickej genetike. Telomerické array sú tandemovo opakujúce sa DNA-proteínové štruktúry, ktoré sa nachádzajú na koncoch chromozómov. Niekedy sú označované ako minisatelity. Satelity sú veľmi veľké tandemové opakovania od stoviek cez tisíce až miliónov báz. V dôsledku obrovskej dĺžky je práca so satelitmi veľmi obtiažna (Rubicz et al., 2007).

1.5.4 Retroelementy

Retroelementy sú elementy DNA, ktoré boli transkribované do RNA s aktívnych genomických kópií a prostredníctvom reverznej transkripcie boli prepísané do DNA (Rubicz et al., 2007). Retroelementy tvoria veľkú časť nášho genómu. Skoro polovica cicavčieho genómu je odvodená od prastarých transpozibilných elementov.

Retroelementy rozdeľujeme do dvoch veľkých kategórií na non-LTR a LTR elementy (Bannert a Kurth, 2004). Jedným z najvýznamnejších príkladom retroelementov sú Alu rodiny, ktoré pozostávajú z krátkych rozptýlených repetitívnych jednotiek (SINEs), ktoré sú rozptýlené v genóme primátov. V haploidnom genóme človeka sa ich vyskytuje asi 500 000 kópií (Batzer et al., 1994). Alu pozostávajú z dvoch približne 150 bp jednotiek a vysoko repetitívnych sekvencií okolo 300 nukleotidov, ktoré mohli byť náhodne inzertované (Deininger a Batzer, 1993). U ľudí sa vyskytuje približne 500 000 kópií na haploidný genóm. Alu sekvencie boli pôvodne odvodené od 7SL RNA génu (Batzer et al., 1994).

V antropologických genetických štúdiách sa retroelementy využívajú pre ich značný polymorfizmus. Inzercia elementov je pomerne vzácna (Rubicz et al., 2007). Alu inzercie sú autozomálne markery, ktoré reflektujú aj maternálnu aj paternálnu históriu populácie. Alu inzercie sú pomerne stabilné markery, ktoré nám ukazujú unikátne evolučné udalosti. Ďalšou výhodou Alu elementov je, že u nich nedochádza k paralelným pribúdaním alebo stratam Alu elementov na jednotlivých lokusoch na chromozómoch a tak všetky chromozómy, ktoré obsahujú polymorfický Alu element sú identické v celej rodovej línii (Nasidze et al., 2001).

Inými retroelementami sú L1 elementy a HERVs (ľudské endogénne retrovírussy), ktoré patria do skupiny LINEs, čiže dlhých rozptýlených jadrových elementov. Tieto retroelementy predstavujú nádej na porozumenie etiológie určitých chorôb. Taktiež majú dobré uplatnenie pri fylogenetických štúdiách ľudskej populácie (Rubicz et al., 2007).

1.5.5 Náhodne amplifikovaná polymorfická DNA (RAPD)

Náhodne amplifikovaná polymorfická DNA má iba obmedzené použitie v štúdiách ľudskej diverzity. RAPD sa vyznačuje používaním krátkych 8-12 báзовých primerov na náhodnú amplifikáciu úsekov DNA. Variácia sa pozoruje prítomnosťou, absenciou alebo rôznou dĺžkou jednotlivých bandov. Skoršie výskumy založené na metóde RAPD sľubovali fylogenetickú rekonštrukciu ľudskej populácie známej histórie dali presné výsledky. Avšak táto metóda sa už v súčasnosti nevyužíva pri štúdiách ľudskej fylogenézy v dôsledku kritiky, že väčšina fragmentov je nešpecifická a preto nemôže byť reprodukovateľná (Rubicz et al., 2007).

1.5.6 Markery chromozómu Y

Prvý polymorfný molekulárny marker chromozómu Y bol identifikovaný v roku 1985 a označuje sa ako 12f2 delécia (Casanova et al., 1985) a v súčasnom haploskupinovom strome určuje haploskupinu J. O rok neskôr bol identifikovaný druhý marker s označením 49f (Ngo et al., 1986). Chromozóm Y pozostáva prevažne z veľkého množstva chromatínu a iba niekoľkých génov, ktoré sú zodpovedné za determináciu mužského pohlavia. Iba na malej oblasti na oboch koncoch ramien chromozómu Y, v tzv. pseudoautozomálnom regióne, dochádza k rekombinácii s chromozómom X. Približne 95% chromozómu Y nerekombinuje. Táto oblasť sa označuje ako MSY (Male-specific region of the Y). A práve táto mužská špecifická oblasť sa využíva pri populačných, molekulárno antropologických a genetických štúdiách. MSY je haploidná a v každej mužskej bunke sa vyskytuje iba v jednej kópii. Y chromozómové DNA polymorfizmy sa využívajú vo fylogenetických populačných rekonštrukciách. V dôsledku chýbajúcej rekombinácie sa každá mutácia prejaví aj v budúcich populáciách.

Medzi najrozšírenejšie MSY polymorfizmy, ktoré sa využívajú vo fylogenetických štúdiách patria binárne markery a STRs (Rubicz et al., 2007). Medzi bialelické markery zahrňame SNPs a Alu inzercie. Bialelické markery sa využívajú na definovanie hlavných Y chromozómových línií alebo haploskupín (Rubicz et al., 2007). Okrem bialelických markerov sa na Y chromozóme nachádzajú 2 minisatelity a viac než 200 Y STR (Butler, 2005).

Y-SNPs zohrávajú dôležitú úlohu v štúdiách ľudských migrácií pretože umožňujú efektívne vyhodnotenie rozdielov medzi jednotlivými populáciami (Butler, 2005). Polymorfizmy chromozómu Y nám umožňujú sledovať migrácie mužov, analyzovať patrilokalitu a ďalšie javy, ktoré sú ovplyvnené mužmi.

1.5.7 Markery mtDNA

V ľudskom genóme sa okrem MSY, vyskytuje ešte ďalšia nerekombinujúca oblasť. Mitochondriálna DNA je dvojvláknová, kruhová molekula DNA, ktorá má bakteriálny pôvod. MtDNA sa dedí maternálnu dedičnosťou. V jednej bunke sa vyskytuje veľké množstvo kópií mtDNA. Počet kópií sa líši aj v jednotlivých typoch tkaniva. Analýza mtDNA sa využíva pri štúdiách archaickej DNA, kde je materiál už značne degradovaný. Molekula MtDNA pozostáva z 16 569 bp, ktoré sú zložené s kódujúcich oblasti s 37 génmi

a 2 nekódujúcich hypervariabilných oblastí (HVS-1 a HVS-2). Molekula mtDNA mutuje 10 krát častejšie ako jadrová DNA čo je spôsobené absenciou účinných reparačných mechanizmov.

Medzi mtDNA markery, ktoré sa používajú pri populačných štúdiách patria hlavne RFLPs a sekvenovanie HVS-1 a HVS-2, ale v súčasnosti sa už prechádza k celogenómovému sekvenovaniu.

RFLPs sa využívajú na definovanie SNPs, ktoré určujú hlavné haploskupiny mtDNA stromu. HVS-1 a HVS-2 sekvencie sa využívajú na charakterizovanie diverzity medzi jednotlivými haploskupinami (Rubicz et al., 2007).

Analýzou mtDNA bolo zistené, že biologický najstaršie a teda aj najdiverzifikovanejšie populácie sa vyskytujú v Afrike. Africké línie sa vyznačujú hlbokým vetvením, zatiaľ čo neafrické línie vykazujú mladé usporiadanie. Analýzou mtDNA bolo vypočítané že náš najstarší spoločný predok žil pred $171\,000 \pm 50\,000$. Spoločný predok najmladších afrických a najstarších neafrických línií žil pred $52\,000 \pm 28\,000$ rokmi.

1.5.8 Polymorfizmy chromozómu X

Chromozóm X je približne tri krát väčší než chromozóm Y. V dôsledku toho, že muž má iba jeden chromozóm X, tak je efektívna veľkosť v porovnaní s autozómami je troj štvrtinová. Avšak v porovnaní s mtDNA alebo Y chromozómom je tri krát väčšia. Štúdie polymorfizmov chromozómu X poskytujú preniknutie do modernej histórie ľudstva, ktorá je o niečo viac ovplyvnená ženami než mužmi (Yu et al., 2002).

Na chromozóme X boli sledované niektoré kódujúce oblasti ako napríklad E1 podjednotku pyruvát dehydrogenázy (Harris a Hey, 1999), či 8 kb úsek dystrofinového génu (Zietkiewicz, 1998). Yu et al. (2002) sledoval genetickú variabilitu 10 kb oblasť nekódujúcej sekvencie chromozómu X, na ktorej identifikoval líniu špecifickú pre Euráziu, ktorá sa vznikla pred menej ako 140 000 rokmi.

Harris a Hey (1999) analyzovali 4 200 bp oblasť PDHA1 génu, v ktorej zistili 25 polymorfných miest a 5 inzercií/delécií. Africké vzorky preukázali oveľa väčšiu variabilitu než vzorky neafrické. Parameter migračnej miery je najvyšší medzi africkými populáciami. TMRCa medzi šimpanzmi a človekom bola na základe PDHA1 génu určená na 5 miliónov rokov.

V štúdií Anagnostopoulou et al. (1999) bola skúmaná 5 Mb oblasť Xq22.

1.6 Haploskupiny chromozómu Y

Chromozóm Y je vysoko informatívny lókus, ktoré je mimoriadne vhodné pre fylogenetické štúdie. Y-chromozomálna fylogenéza bola skúmaná pomocou denaturačnej vysoko výkonnej kvapalinovej chromatografie (DHPLC) založenej na mutácií detegovanej v 64 kb DNA u 43 jedincov prostredníctvom výskumu Thomson et al (2000). Jeho tím detegoval 56 variant, ktoré rozlišujú 32 línii. Od prvej analýzy chromozómu Y sa každým dňom postupne rozširovalo množstvo detegovaných variant a vytvárali sa ďalšie nové línie. V súčasnosti je Y haploskupinový strom rozdelený do 20 hlavných vetiev, ktoré sa označujú písmenami od A po T. Každá vetva sa ešte ďalšími mutáciami vetví na jednotlivé haploskupiny. Zjednodušený fylogenetický strom chromozómu Y, ktorý bol zostavený prostredníctvom YCC v roku 2002 je uvedený v prílohe 4.

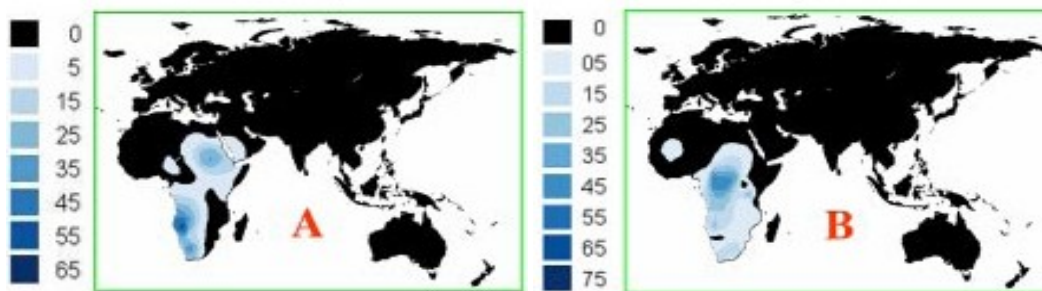
Jednotlivé polymorfizmy, ktoré definujú haploskupiny sú označované písmenom „M“ alebo „P“. Mutácie, ktoré sú označované predponou „M“ (zastupuje označenie mutácia), boli detegované a publikované prostredníctvom výskumu P. Underhilla a jeho spolupracovníkmi. Množstvo mutácií je označovaných predponou „P“ (zastupuje výraz pre polymorfizmus) a boli popísané M. Hammerom.

Medzi najstaršie haploskupiny chromozómu Y patria haploskupiny A a B. Najstaršou haploskupinou je haploskupina A, ktorá sa objavila približne pred 55 000 rokmi. Haploskupina A je definovaná 2 mutáciami (M91 a P97). Je rozčlenená do 12 vetiev s 45 mutáciami (Karafet et al., 2008). Táto haploskupina sa vyskytuje prevažne iba na Africkom kontinente a v populáciách odvedených z Afriky v modernej dobe, predovšetkým otrokármi do Ameriky. Z neafrických populácií bola v nízkych frekvenciách objavená v Turecku (Cinnioglu et al., 2004), na Cypre (Capelli et al., 2005), Sardínii (Scozzari et al., 2001) a v Ománe (Luis et al., 2004). Z afrických populácií sa vo zvýšenej frekvencii vyskytuje u populácií Sánov, Bushmanov, Hadza, Kung, Khwe, Malijčanov, Sudáncov a Etiópcanov. Vo veľmi vysokej frekvencii sa tieto najstaršie haploskupiny chromozómu Y vyskytujú v populácií Khoisanov, kde bola zistená až 70% jedincov (Underhill et al., 2000).

Haploskupina B sa v nízkej frekvencii vyskytuje v celej Afrike. Táto haploskupina bola detegovaná aj u Pakistanskej populácií. Najväčšie zastúpenie však má v populácií Pygmejov. Najväčšia populačná expanzia tejto haploskupiny v Afrike bola približne pred 90 000- 130 000 rokmi. Je definovaná 4 mutáciami (M60, M81, P85 a P90) a ďalej sa člení

na 17 vetiev s 28 mutáciami (Karafet et al., 2008). Haploskupina B sa vo vysokej frekvencii vyskytuje v populácií Pygmejov (Hammer et al., 2001; Underhill et al., 2001; Cruciani et al., 2002).

Polymorfizmus A-M13, ktorý definuje haploskupinu A a B-M60 a ktorý definuje haploskupinu B sa vo vysokej frekvencii vyskytuje v Nilo-Saharských skupinách u Sudánskych Núbijcov a v nízkej frekvencii v Afro-Aziatskej skupinách. Významný výskyt haploskupiny B-M60 bol zaznamenaný v populácií Hausa (15,6%) a v populácií Koptov (15,2%) (Hassan et al., 2008).



Obr. 1. Výskyt dvoch najstarších haploskupín chromozómu Y (Chiaroni et al., 2009).

Od mutácie v polymorfizmu M168, ktorá sa objavila približne pred 50 000 rokmi sú odvodené haploskupiny C-T.

Haploskupina C sa po prvýkrát objavila pred 50 000 rokmi a je definovaná mutáciami RPS4Y711, M216, P184, P255 a P260. V súčasnosti je rozvetvená do 19 vetiev s 29 vnútornými mutáciami (Karafet et al., 2008). Haploskupina C je rozšírená najmä na Ázijskom kontinente, Južnom Pacifiku a v nízkej frekvencii aj u pôvodnej Americkéj populácie. Haploskupina C je rozdelená na 7 hlavných vetiev a to na paraskupinu C* a haploskupiny C1 – C6. Haploskupinu C2 je rozšírená v celej Polynézii, Melanézii, Novej Guinei a Indonézii. V juhovýchodnej alebo strednej Ázii má svoj pôvod haploskupina C3, ktorá sa potom rozšírila do severnej Ázie a nakoniec až do Ameriky pred 6 000 až 8 000 rokmi (chromosomal laboratories).



Obr. 2. Výskyt haploskupiny C vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Haploskupina D bola v roku 2002 definovaná iba jedinou mutáciou. A ďalších 12 markerov definovalo jednotlivé línie haploskupiny D. V roku 2008 je haploskupina D už klasifikovaná prostredníctvom dvoch mutácií (M174 a JST021355) a 21 mutácií rozčleňuje haploskupinu D na ďalšie haploskupiny. Haploskupina D sa vyskytuje v strednej Ázii a v Japonsku. V nižších frekvenciách ju môžeme nájsť v juhovýchodnej Ázii a na Adamanských ostrovoch (Karafet et al., 2008). Polymorfizmus M174, ktorý definuje túto haploskupinu sa vo východnej Ázii vyskytuje v priemere v 9,6 % s najvyššou frekvenciou výskytu v Tibete (41,31%), Japonsku (35,08%) a na Adamanských ostrovoch (56,25%). V ostatných východoázijských populáciách sa vyskytuje s frekvenciou menšou ako 5% (Shi et al., 2008).



Obr. 3. Výskyt haploskupiny D vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Najviac diverzifikovanou haploskupinou spomedzi všetkých haploskupín chromozómu Y je haploskupina E. Je definovaná 18 mutáciami (SRY4064, M96, P29, P150, P152, P154, P155, P156, P162, P168, P169, P170, P171, P172, P173, P174, P175, a P176) a je rozvetvená do 83 vetiev (Karafet et al., 2008).

Haploskupina E bola pozorovaná najmä v Afrike, Európe a Blízkom východe (Semino et al., 2004). Haploskupina E sa rozvetvuje na 3 základné vetvy: E1a, ktorá je definovaná polymorfizmom M33, E2, ktorú definuje polymorfizmus M75a E1b1, ktorú určuje polymorfizmus P2. Samostatnou vetvou je aj paraskupina E* (xE1a, E2, E1b1). Klady E1a a E2 sa vyskytujú v rámci celej Afriky (Underhill et al., 2000; Cruciani et al., 2002). Haploskupina E1a sa vyskytuje prevažne v západnej Afrike, hlavný výskyt je v Mali (34 % celkovej populácie Malijčanov). Haploskupina E1a bola detegovaná aj medzi Marockými Berbermi, v Burkina Faso, na severe Kamerunu, v Senegale, Sudáne a Egypte. V Európe a v západnej Ázii boli zistené haploskupiny, ktoré sú odvodené od polymorfizmu P2 a boli zistené vo frekvencii <25% (Hammer et al., 2000, 2001; Semino et al., 2000; Cinnioglu et al., 2004).

Vetva E1b1 sa rozdeľuje na dve monofyletické vetvy: E1b1a a E1b1b1. Polymorfizmus M2 definuje haploskupinu E1b1a a polymorfizmus M35 definuje haploskupinu E1b1b1. Obidve haploskupiny sú frekventované v Afrike (Underhill et al., 2000; Cruciani et al., 2002). Polymorfizmus sa okrem Afriky vyskytuje aj v Európe (Semino et al., 2000) a v západnej Ázii (Underhill et al., 2000; Cinnioglu et al., 2004). Predpokladá sa že haploskupina E1b1b1 má svoj pôvod v subsaharskej Afrike a počas Pleistocénu sa rozšírila na Blízky Východ a do severnej Afriky (Underhill et al., 2001). Do južnej Európy sa dostala počas Neolitickej expanzie (Underhill et al., 2001; Semino et al., 2000; Hammer et al., 1998).

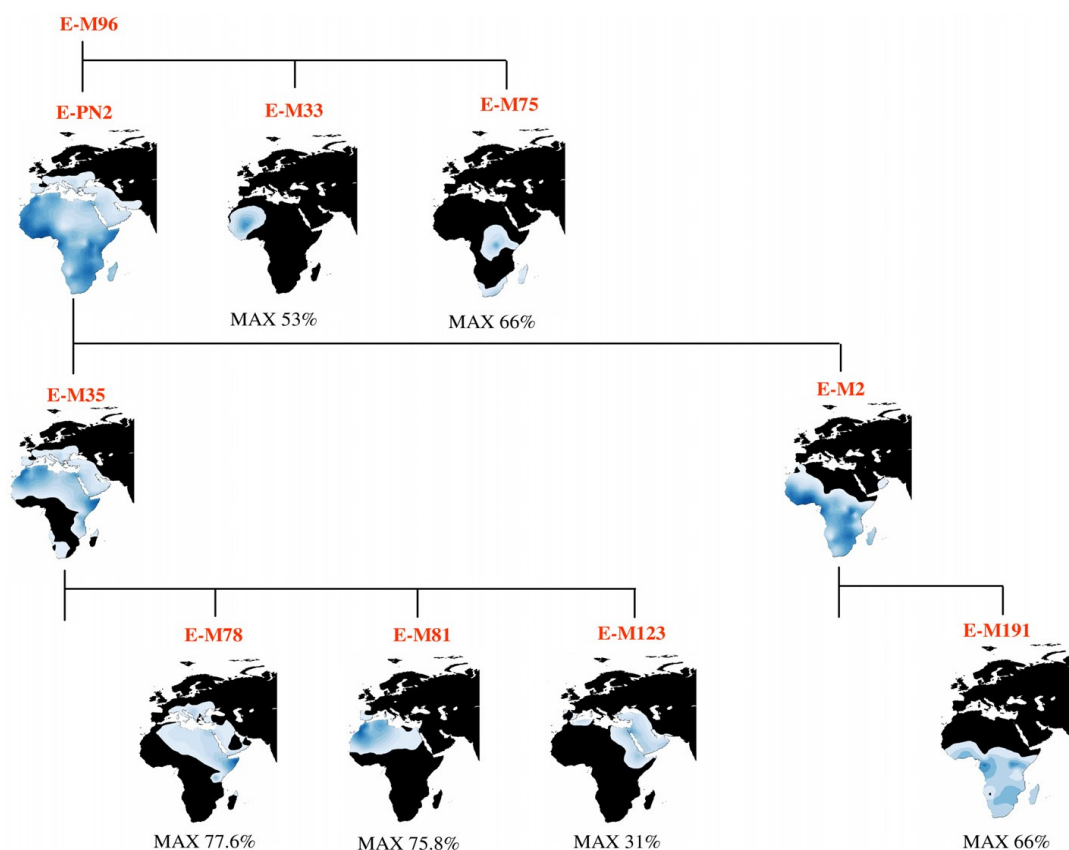
Haploskupina E1b1b1 sa ďalej vetví na 3 hlavné subklady (M78, M81 a M123) a paraskupina M35*. Jednotlivé subklady nie sú rovnomerné rozšírené po celom Africkom kontinente. M78 bolo pozorovaná v severnej a východnej Afrike, západnej Ázii a v celej Európe (Underhill et al., 2000; Cruciani et al., 2002; 2004; Arredi et al., 2004; Semino et al., 2004). Cruciani et al (2004) zistil, že tohto polymorfizmu, ktorú určuje haploskupinu E1b1b1a, ktorá sa objavila pre 23 200 rokmi vo východnej Afrike, sa vyskytuje vo východnej Afrike (21,5%), severnej Afrike (18,5%), na Blízkom Východe (5,8%) a v Európe (7,2%). Polymorfizmus M81 sa vyskytuje v severnej Afrike. V severozápadnej Afrike sa vyskytuje s frekvenciou vyššou než 80% (Bosch et al., 2001; Cruciani et al., 2002; 2004). Najjužnejšie bol tento polymorfizmus detegovaný v populácií Tuarégov pochádzajúcich z Nigeru, kde bol zistený u 9,1% jedincov (Bosch et al., 2001). V subsaharskej Afrike tento polymorfizmus nebol nájdený. Distribúcia tohto polymorfizmu je spojená s rozširovaním sa berbersky hovoriacich populácií po kontinente. V nízkej frekvencii sa vyskytuje u Arabsky hovoriacich populáciách Maroka (Bosch et al., 2001, Cruciani et al., 2002; 2004). Mimo Afriku bol tento polymorfizmus zistený v Iberských populáciách s frekvenciou 1,6% – 4,0% v severnom Portugalsku, južnom Španielsku, Rakúsku a Baskitsu. V južnom Španielsku sa vyskytuje s frekvenciou 12,2% (Bosch et al., 2001). Polymorfizmus M123 sa vyskytuje prevažne vo východnej Afrike. Haploskupina E1b1b1c, ktorá je definovaná týmto polymorfizmom bola zistená v Etiópií (11,2%), Blízkom Východe (3,7%), Európe (1,7%) a severnej Afrike (0,9%). Paraskupina M35* sa vyskytuje v južnej (15,2%) a východnej Afrike (10,5%). Vzácné sa vyskytuje aj v severnej Afrike a Európe s frekvenciou 0,4%-0,5% (Cruciani et al., 2004).

Haploskupina E je tesne spojená s haploskupinou D, ktorá sa však v Afrike doposiaľ nenašla, čím vlastne ostáva otvorená možnosť, že haploskupina E vznikla na Blízkom alebo strednom východe a potom sa spätnou migráciou dostala do Afriky.

Najväčšiu geografickú distribúciu má vetva E1b1 a jej dve najdôležitejšie sublinie sú E1b1a a E1b1b1. Polymorfizmu M2, ktorý definuje haploskupinu E1b1a sa vo vysokej frekvencii vyskytuje v subsaharskej a ekvatoriálnej Afrike, kde sa dostal a rošíril prostredníctvom Bantuskej expanzie poľnohospodárov (Underhill et al., 2001). E1b1a haploskupina sa veľmi často vyskytuje aj u Afrických Američanoch. Druhou pomerne veľmi rozšírenou líniou je haploskupina E1b1b1, ktorú definuje polymorfizmus M35. Odvodená alela polymorfizmu M35 vznikla pred 29 000 rokmi s najväčšou pravdepodobnosťou vo východnej Afrike (Semino et al., 2004). Kompletné vetvenie haploskupiny E je uvedené v prílohe 4.



Obr. 4. Výskyt haploskupiny E vo svete (Chiaroni et al., 2009).



Obr. 5. Výskyt hlavných línií haploskupiny E v Afrike (Chiaroni et al., 2009).

Od mutácie v polymorfizmu M89, ktorá sa objavila pred približne 45 000 rokmi sa odvodzujú haploskupiny F – T.

Haploskupina F je treťou hlavnou a veľmi rozšírením, subklastrom línie M168 a je definovaná najmenej tromi mutáciami. Haploskupina F sa vyvinula mimo Afriku počas včasnej diverzifikácie a migrácie moderných ľudí približne pred 30 000 až 40 000 rokmi (Kivisild et al., 2003). Sengupta et al (2006) zistil výskyt haploskupiny F2 u 2,9% jedincov východnej Ázie.

Paraskupina F* bola pozorovaná v nízkej až strednej frekvencii na Indickom subkontinente (Kivisild et al., 2003; Karafet et al., 2005; Sengupta et al., 2006). Sengupta et al (2006) pozoroval túto paraskupinu u 5,2% jedincov Indie.

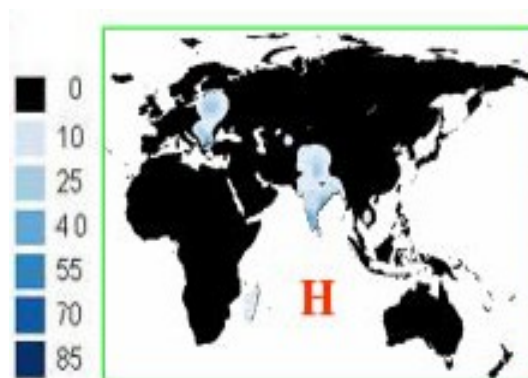
Haploskupina G je definovaná 2 mutáciami. Prostredníctvom 11 mutácií vrámci haploskupiny G je rozdelená na 10 línií. Haploskupina G je rozdelená do 2 subklad. G1 je definovaná mutáciou M285 a G 2 mutáciou M287 (Karafet et al., 2008). Je rozptýlená po celej strednej Ázii, Európe a Strednom Východe. Objavila sa pred 10 000 až 20 000 rokmi na východnom okraji Stredného Východu v Indií alebo Pakistane. G2 vetva tejto haploskupina sa veľmi často vyskytuje v Európe a Strednom Východe (chromosomal laboratories). Pomerne vo vysokej frekvencii až 30 % sa objavuje v Gruzínsku. V Európe je vyšší výskyt tejto haploskupiny v južných oblastiach ako napríklad v severnom a strednom Taliansku sa vyskytuje s frekvenciou 10 % a na Sardínii s frekvenciou 14,2%. Smerom na sever už frekvencia výskytu klesá na 4 % na Ukrajine, v Českej a Slovenskej republike je to len 4,4% , v Chorvátsku dokonca len 1,7 5. A v Nemecku či Dánsku vôbec nebola zistená (Semino et al., 2000).



Obr. 6. Výskyt haploskupiny G vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Haploskupina H je definovaná jediným markerom odvodeným od M69 (Karafet et al., 2008). sa vyskytuje predovšetkým v Indií, Srí Lanke, Pakistane a na Madagaskare. Odhaduje sa, že sa táto haploskupina vyskytuje u Rómskej populácií s frekvenciou vyššou

ako 50 %. Štúdium Slovenskej, Bulharskej, Macedónskej a Valašskej populácie Rómov zistilo výskyt haploskupiny H u 40,0%, 44,8%, 59,6% a 73% jedincov (Petrejčíková et al., 2009; Gresham et al., 2001; Kalaydjieva et al., 2001; Pericic et al., 2005).

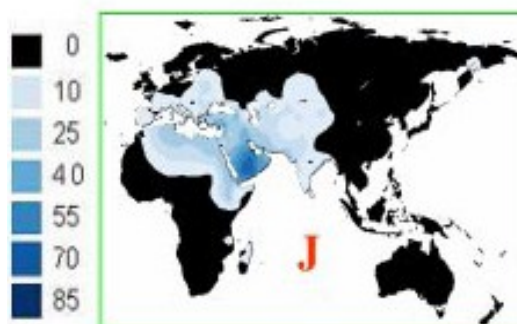


Obr. 7. Výskyt haploskupiny H vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Haploskupina I je v súčasnosti definovaná 6 mutáciami. Haploskupina I je rozdelená do 2 subhaploskupín: I1, ktorá je definovaná mutáciami P30, P40, M253, M307, a M450 a I2, ktorá je určená mutáciou P215. Haploskupina I predstavuje jednu z dvoch najrozšírenejších Y chromozómových haploskupín v Európe. I1 sa vyskytuje prevažne v severnej Európe, zatiaľ čo I2 je viac frekvencovaná vo východnej Európe a na Balkáne (Karafet et al., 2008). Do Európy sa rozšírili prostredníctvom Gravettianskej kultúry pred 20 000 až 25 000 rokmi.

Haploskupinu J je definovaná prostredníctvom troch mutácií (12f2a, M304 a P209). Haploskupina J prostredníctvom 39 mutácií v rámci haploskupiny vytvára celkom 34 línii. Je rozdelená na dve základné vetvy a to vetvu J1 a vetvu J2 a paraskupinu J*. Haploskupina J sa bežne vyskytuje na Strednom východe, severnej Afrike a Etiópií (Hammer et al., 2000; 2001; Underhill et al., 2001; Semino et al., 2002; Cinnioglu et al., 2004; Sengupta et al., 2006.). Haploskupina J je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich haploskupín severnej Afriky. V pomerne vysokej frekvencii sa objavuje u egyptského a arabského obyvateľstva. Vo východnej Afrike ju Semino et al (2002) detegoval vo vysokej frekvencii v populácii Amhara z Etiópie. Pôvod tejto skupiny je na Strednom Východe. Pomocou obchodníkov sa táto haploskupina pred 7 000 až 9 000 rokmi rozširovala zo Stredného Východu postupne do Európy, strednej Ázie, Indie Pakistanu. Predpokladá sa, že sa táto haploskupina vyvinula z haploskupiny F pred 45 000 až 50 000 rokmi. J1 vetva haploskupiny sa v najvyššej koncentrácii vyskytuje na Strednom Východe, v severnej Afrike a Etiópií. Vetva J2 sa vyskytuje v celej Európe, Indii, Pakistane a Nepále.

Haploskupina J sa taktiež vyskytuje v Indii, kde sa dostala pravdepodobne z poľnohospodárstvom (Underhill, 2003). Na obrázku 8 môžeme vidieť, že v Európe sa haploskupina J vyskytuje najmä v južných a stredných a východných oblastiach.

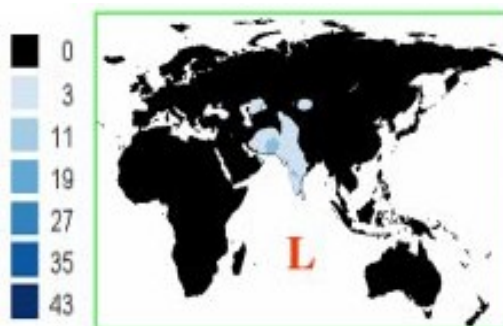


Obr. 8. Výskyt haploskupiny J vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Mutácia v polymorfizme M9, ktorá vznikla pred 40 000 rokmi definuje haploskupiny K – T.

Haploskupina K je charakterizovaná odvodenou alelou na 4 miestach (M9, P128, P131 a P132). Po prvýkrát objavila v Iráne alebo na Juhu strednej Ázie pred 40 000 rokmi Prostredníctvom ďalších 5 mutácií je haploskupina k rozdelená do 4 línii (Karafet et al., 2008). Haploskupina K bola pozorovaná v Indii, Strednom Východe a Európe (Underhill, 2003). Haploskupina K1 sa v nízkych frekvenciách vyskytuje v Indii aj v Pakistane. Línie K2, K3 a K4 boli nájdené v Oceánii, Indonézií a Austrálii. K2 haploskupina bola premenovaná na novú haploskupinu T (Karafet et al., 2008).

Haploskupina L je definovaná 6 mutáciami (M11, M20, M22, M61 M185 a M295). Majoritný výskyt haploskupiny L je na indickom subkontinente. Haploskupina L sa taktiež vyskytuje na Strednom Východe, v Strednej Ázii, severnej Afrike a v Európe na pobreží Stredozemného mora (Karafet et al., 2008). Najväčšiu frekvenciu výskytu má v juhovýchodnej Ázii (Underhill, 2003), kde na niektorých miestach sa vyskytuje s frekvenciou vyššiu než 25 %.



Obr. 9. Výskyt haploskupiny L vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Haploskupina M je definovaná mutáciou P256. Vetví sa do 3 hlavných línií. Lúnia M1, predtým bola označovaná ako haploskupina M je definovaná 7 mutáciami (M4, M5=P73, M106, M186, M189, M296 a P35). M2 lúnia je definovaná 2 mutáciami (M353 a M387). M3 lúnia je definovaná mutáciami P117 a P118 (Karafet et al., 2008). Haploskupina M sa vo vysokej frekvencii sa vyskytuje na Irian Jayskej vysočine, na vysočine v Papue Novej Guinei a v Novej Británii. V menšej frekvencii ju môžeme nájsť medzi populáciou západnej Samoe (chromosomal laboratories).

Monofyletická haploskupina N je definovaná jedinou mutáciou M231. Prostredníctvom 10 mutácií sa ďalej delí na 9 vetiev (Karafet et al., 2008). Vyskytuje sa prevažne u kaukazoidnej a mongoloidnej populácie. Takisto sa vyskytuje aj u uralsky hovoriacich populáciách (Fíni, Maďari). Haploskupina má svoj pôvod v severnej Číne alebo Mongolsku a potom sa rozšírila na Sibír. Na Sibíry sa vyskytuje v 43 % frekvencii (chromosomal laboratories).

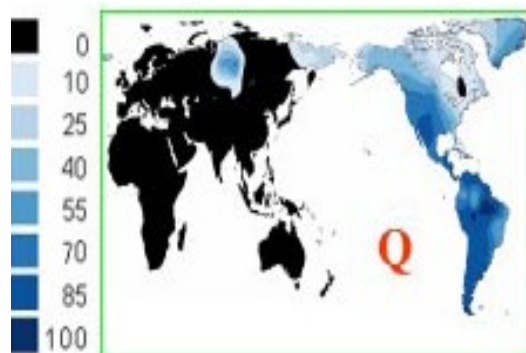
Haploskupina O je definovaná 4 mutáciami M175, P186, P191 a P196. Pomerne veľmi diverzifikovaná skupina je 44 vnútornými mutáciami rozdelená do 30 vetiev. Haploskupina O sa vyskytuje hlavne vo východnej Ázii (Karafet et al., 2008). Početnejší výskyt haploskupiny O bol zaznamenaný u čínskej populácie Hanov. O1 haploskupina bola vo veľmi vysokej frekvencii nájdená u Tchajwanských aboriginálcov. O2 haploskupina má dve základne línie O2a a O2b. O2a sa vyskytuje v juhovýchodných ázijských populáciách v Malajzii, Vietname, Indonézií a v severnej Číne. Haploskupina O2b sa vo vysokej frekvencii vyskytuje u Japonskej a Koréjskej populácií a o niečo nižšej frekvencii sa vyskytuje aj u ostatných východoázijských populáciách (chromosomal laboratories).

Pred 35 000 rokmi došlo k mutácií v polymorfizme M45. Odvodená alela v polymorfizme M45 definuje haploskupiny P, Q a R, S a T.

Haploskupina P pozostáva s dvoch pomerne veľmi rozšírených Q a R línií (Karafet et al., 2008).

Haploskupina Q je definovaná iba jedinou mutáciou M242, ktorá sa po prvý krát objavila pred 15 000 až 20 000 rokmi. Svoj pôvod má v strednej Ázii a následne sa rozširovala cez severnú Áziu až do Ameriky. Môžeme ju nájsť aj v severnej a strednej Ázii. Vo vysokej frekvencie výskytu sa objavuje u Sibírskych populácií (Karafet et al., 2002). Na obrázku 13 môžeme vidieť, že haploskupina Q je kompletne rozšírená v severnej a južnej Amerike. V nízkej frekvencii ju môžeme nájsť v Európe, východnej Ázii a na Strednom Východe (Zegura et al., 2004). V súčasnosti je známych 14 subklad haploskupiny Q. Polymorfizmus M3 je unikátnou haploskupinou pôvodných amerických

populácií a svoj začiatok má pred 8 000 až 12 000 rokmi počas migrácie do Ameriky. Haploskupina Q je pomerne rozšírenou haploskupinou severnej Eurázie. Nedefinovanú paraskupinu Q* v nízkej frekvencii môžeme nájsť v Pakistane a v Indii (Karafet et al., 2008).



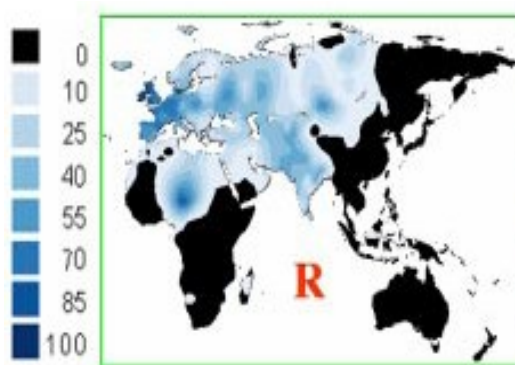
Obr. 10. Výskyt haploskupiny Q vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Haploskupina R je definovaná 9 mutáciami (M207, M306, P224, P227, P229, P232, P280 a P285). Prostredníctvom 42 mutácií v rámci haploskupiny R je rozdelená na 28 subhaploskupín (Karafet et al., 2008).

Zahŕňa dve hlavné vývojové línie a to R1 a R2 líniu a ešte tu môžeme zaradiť aj nerozlíšenú vetvu R*. Nerozlíšenú R1* líniu môžeme vo výnimočných prípadoch nájsť v malej frekvencii v Európe, Strednej a južnej Ázii. R1 vývojová línia má možný pôvod v Európe a potom sa migráciami dostala do Ázie. Haploskupinu R2, ktorá je definovaná polymorfizmom M124, môžeme nájsť v južnej Ázii, na Kaukaze, v strednej Ázii a východnej Európe.

Líniu R1 môžeme rozdeliť ešte na ďalšie dve línie, R1a a R1b. Haploskupina R1a sa obvykle vyskytuje u populácií Slovanov vo východnej Európy a u populáciách strednej a západnej Ázie, Indie a Pakistanu. Pravdepodobný pôvod má v Kurdskej populácii Eurázijských stepí severne od čierneho a Kaspického Mora. Haploskupina R1b sa objavila pred 35 000 rokmi a má svoj pôvod v juhozápadnej Ázii. Predstavuje veľmi frekventovanú haploskupinu u západoeurópskych populácií (chromosomal laboratories). Sengupta et al (2006) zistil výskyt haploskupiny R u 25,7% populácie Indie a u 40% obyvateľstva Pakistanu. V nízkych frekvenciách sa haploskupina R vyskytuje aj u Afrického obyvateľstva. Výskyt haploskupiny R v Afrike sa väčšinou obmedzuje iba na severnú a subsaharskú Afriku. Vo východnej a južnej Afrike sa haploskupina R nevyskytuje. Hassan et al (2008) zistil výskyt haploskupiny R u 17,3% obyvateľstva Sudánu. Haploskupina R sa v Sudáne vyskytuje najmä v populácii Fulbov (53,8%) a populácie

Hausa (40,6%). U afrického obyvateľstva bola haploskupina R zistená vo vysokej frekvencii v populácii Ouldeme v severnom Kamerune, kde sa vyskytuje vo frekvencii 95% (Cruciani et al., 2002). Aj približne polovica súčasných Európanov zdieľa polymorfizmus M173, ktorý definuje haploskupinu R (Semino et al., 2000; Underhill et al., 2001). Kompletné vetvenie haploskupiny je R je uvedené v Prílohe 4.



Obr. 11. Výskyt haploskupiny R vo svete (Chiaroni et al., 2009).

Najnovšie objavenými haploskupinami sú haploskupiny S a T. Haploskupina S bola objavená v Indonézii a Oceánii. Je definovaná 3 mutáciami (M230, P202 a P204). Celkovo 8 mutácií rozpoznáva v rámci haploskupiny S 5 podhaploskupin a jednu paraskupinu S*. Predtým bola známa ako haploskupina K-M230 (Karafet et al., 2008).

Haploskupina T je definovaná prostredníctvom 4 markerov (M70, M193, M272, M184). Prostredníctvom 6 mutácií je rozdelená do 2 subklad a jednej paraskupiny. Haploskupina T sa v malých frekvenciách vyskytuje na Strednom Východe, Afrike a Európe (Karafet et al., 2008).

2 CIELE PRÁCE

V rámci teoretickej časti spracovať problematiku histórie populácie Fulbov, markerov chromozómu Y najmä SNP polymorfizmov, diverzity chromozómu Y a využitia technológie LabMAP Luminex, ako rýchlej, robustnej a jednoduchej metódy, ktorá umožňuje detekciu SNPs chromozómu Y.

Hlavným cieľom tejto štúdie bola analýza SNP polymorfizmov chromozómu Y u nomádskeho skupín Fulbov, ktoré pochádzajú z jedenástich rozličných lokalít z piatich štátov afrického Sahelu (Niger, Čad, Kamerun, Mali a Burkina Faso). Výsledky analýz SNP polymorfizmov nám umožnia zodpovedať nasledujúce otázky:

- Aký je Y chromozómový profil u vybranej kočovnej populácie Fulbov?
- Aký je ich vzťah k ostatným populáciám Afriky?
- Zastúpením jednotlivých haploskupín sa viac podobajú populáciám z východnej, západnej alebo severnej Afriky?
- Je populácia Fulbov geneticky homogenná tj. budú jednotlivé subpopulácie Fulbov, ktoré žijú v rozdielnej geografickej oblasti zdieľať podobné hodnoty génovej diverzity?
- Bude sa líšiť hodnota génovej diverzity zistenej prostredníctvom mtDNA markerov v práci Černý et al (2006) od diverzity chromozómu Y zistenej v rámci tejto štúdie?

3 MATERIÁL

3.1 Vzorky DNA

Vzorky DNA pochádzajú z 5 štátov strednej a západnej Afriky a to Čadu, Kamerunu, Burkiny Faso, Mali a Nigeru. Celkovo sme skúmali 205 nepříbuzných mužských vzoriek z 11 rôznych subpopulácií Fulbov afrického Sahelu. Oblasť, s ktorých pochádzajú vzorky, sú znázornené na Obr. 12.

Z Čadu máme vzorky z dvoch oblastí: oblasť Bongor (Fbon), ktorá leží v strednej časti toku rieky Logone a z oblasti Linia (Flin), ktorá sa nachádza pri Čadskom jazere. Vzorky s Mali pochádzajú z oblasti Diafarabé (FDia), ktorá leží na strednom toku rieky Niger. Kamerunské vzorky pochádzajú s oblasti Tcheboua (FTch). Z Burkiny Faso sú zastúpené dve oblasti. Jedna leží južne od mesta Fadu Ngourma v oblasti Tindangou (FTin) a druhá sa nachádza južne od mesta Bobo Diulasso v Banfore (FBan). Najviac vzoriek pochádza z Nigeru. Z východného Nigeru je to z oblasti Diffa (FDif), zo stredného Nigeru je to z okrajových častí mesta Zinder (FZin), ďalej sú to vzorky s oblasti Ader (FAde) a Abalak. (FABA) Od Čadského jazera máme ešte vzorky s oblasti Balatungur (FBal).

Vzorky DNA predstavovali bukalne stery, ktoré boli uložené v lyzačnom roztoku. Zloženie lyzačného roztoku je uvedené v Prílohe 1. Vzorky genetického materiálu boli získané vzorkovaním daných oblastí Dr. Černým, vedúcim tejto diplomovej práce. Následne boli prevezené do Laboratória archeogenetiky Archeologického ústavu Akadémie vied v Prahe k nasledovným analýzám.

V Tab 3 sú uvedené počty analyzovaných jedincov populácie Fulbov z jednotlivých oblastí afrického Sahelu.

Tab. 3. Počet analyzovaných vzoriek z jednotlivých oblastí

Oblasť	Počet vzorkov	Oblasť	Počet vzorkov
Diafarabé	25	Diffa	13
Banfora	26	Zinder	16
Tindangou	13	Tcheboua	22
Abalak	21	Bongor	25
Ader	20	Linia	13
Balatungur	13		

Génovú diverzitu a genetickú príbuznosť (F_{st}) analyzovaných subpopulácií Fulbov sme porovnávali aj inými už publikovanými súbormi dát od iných autorov. Prehľad jednotlivých populácií, oblasť odkiaľ jednotlivé vzorky pochádzajú a počty analyzovaných vzoriek v rámci populácie je uvedený v Tab. 4.

Tab. 4. Populácie použité pri zrovnávaní populácie Fulbov pri analýzach genetickej príbuznosti (F_{st}) a génovej diverzity.

Populácia	Kód	n	Oblasť	Referencie
Severná Afrika				
Tunisko	Tun	148	Tunisko	Areddi et al., 2004
Sudán	Sud	40	Sudán	Underhill et al., 2000
Sahawarish	Sah	29	SZ Afrika	Bosch et al., 2001
Berberi	SM-Ber	39	SZ Maroko	Bosch et al., 2001
Arabs	Arabs Eg	143	Egypt	Luis et al., 2004
El-Háyez	elHayez	35	Egypt	Kujanová et al., 2009
Arabi	Al-Ara	35	Alžírsko	Areddi et al., 2004
Berberi	Al-Ber	19	Alžírsko	Areddi et al., 2004
Egypt	N-Eg	44	S Egypt	Areddi et al., 2004
Egypt	S-Eg	29	J Egypt	Areddi et al., 2004
Arabi	M-Ara	49	Maroko	Cruciani et al., 2002
Berberi	NM-Ber	64	Maroko	Cruciani et al., 2002
Južná Afrika				
Khoisan	Khoi	39	JAR	Underhill et al., 2000
Južná Afrika	S-Afr	54	JAR	Underhill et al., 2000
Východná Afrika				
Somálsko	Somalia	201	Somálsko	Sanchez et al., 2004
Hutu	Hutu	69	Rwanda	Luis et al., 2004
Tutsi	Tutsi	94	Rwanda	Luis et al., 2004
Etiópia	Eth	88	Etiópia	Underhill et al., 2000
Wairak	Wairak(Tn)	43	Tanzánia	Luis et al., 2004
Stredná Afrika				
Bantu	Bantu(SC)	14	S. Kamerún	Luis et al., 2004
Stredná Afrika	C-Afr	36	Str Afrika	Underhill et al., 2000
Západná Afrika				
Mali	Mal	44	Mali	Underhill et al., 2000
Tuarégovia	Tgos	21	Mali	Pereira et al., 2010
Fon	Fon(Bn)	100	Benin	Luis et al., 2004
Tuarégovia	Ttan	31	Niger	Pereira et al., 2010
Tuarégovia	Tgor	38	Burkina Faso	Pereira et al., 2010



Obr. 12. Mapa Afriky s označenými približnými oblasťami, s ktorých pochádzajú vzorky DNA
 (1. Diafarabé, 2. Banfora, 3. Tindangou, 4. Abalak, 5. Ader, 6. Zinder, 7. Diffa, 8. Balatungur, 9.
 Linia, 10. Bongor, 11. Tcheboua).

3.2 Signet Y-SNP Identification System

Na detekciu jednotlivých polymorfizmov Y chromozómu sme použili komerčný kit od firmy Marligen. Firma Marligen vyvinula Signet Y-SNP Identification System kit, ktorý umožňuje detekciu 96 SNP polymorfizmov chromozómu Y. Týchto 96 polymorfizmov definuje haploskupiny hlavnej vývojovej vetvy YCC stromu. Polymorfizmy sú pre vysoko efektívnu determináciu genotypu Y chromozómu rozdelené podľa miesta svojho výskytu do 12 multiplexov (Tab. 5).

Charakteristika jednotlivých multiplexov:

1. Určuje nám základné rozdelenie haploskupín podľa vetvenia YCC stromu.
2. Charakterizuje Africké haploskupiny AB odvodené od polymorfizmu M168.
3. Patria tu Ázijské haploskupiny C a D.
4. Africká a stredovýchodná haploskupina E.
5. Eurázijské haploskupiny F, G, H a I.
6. Stredovýchodná haploskupina J.
7. Zahŕňa eurázijské haploskupiny KLMN.
8. Definuje juhovýchodoázijskú haploskupinu O1.
9. Juhovýchodoázijskú haploskupinu O2.
10. Ázijské a pôvodné americké haploskupiny P a Q.
11. Eurázijská haploskupina R1.
12. Eurázijská haploskupina R2.

Tab. 5. Charakteristika jednotlivých multiplexov

Multiplex	A-R	AB	CD	E	FGHI	J
Varianty	M9 M45 M89 M96 M122 M168 M175 M207 M304 M343 AmelXY	M31 M32 M42 M150 M146 M182 P4	M15 M38 M48 M55 M125 M130 M131 M145 M151 M210 M217	DYS391 M2 M33 M35 M58 M75 M78 M81 M123	M26 M52 M170 M201 M253 P15 P16 P37	M47 M67 M92 M172 M241 M267
Multiplex	KLMN	O1	O2	PQ	R1	R2
Varianty	M5 M11 M70 M178 M214 M231 SRY9138 Tat	M88 M95 M101 M103 M119 P31 SRY465	M7 M113 M117 M121 M134 M159 M164	M3 M19 M120 M143 M194 M199 M242 M323	M17 M56 M87 M124 M157 M173 SRY10831	M18 M37 M65 M126 M153 M269 P25 SRY-2627

Celá kitová súprava sa skladá z PCR reakčných zmesí, exonukleázy I (2U/μl), Y SNP Labeling Mixu na fluorescenčné značenie, ktorý je pre všetkých 12 multiplexov rovnaký, zmesí mikrosfér s naviazanými sondami, ktoré sú špecifické pre jednotlivé

multiplexy, mužskej kontrolnej DNA (1ng/μl), ženskej kontrolnej DNA (1ng/μl) a hybridizačného roztoku (Marligen biosciences).

Tab. 6. Polymorfizmy, ktoré boli použité v práci, ich poloha na chromozóme Y a mutácia, upravené podľa Karafet et al (2008).

Polymorfizmus	Poloha na chromozóme	Mutácia
M2	12606580	A -> G
M9	20189645	C->G
M33	20199838	A -> C
M35	20201091	G -> C
M45	20327175	G->A
M58	20195692	G -> A
M75	20349565	G -> A
M78	20352691	C->T
M81	20351960	C->T
M89	20376701	C->T
M96	20238386	G->C
M122	20224062	T->C
M123	20223974	G -> A
M168	13323385	C->T
M175	14018100-14018104	-5bp Del
M207	14091377	A->G
M304	21159241	A->C
M343	2947824	C->A
DYS391	13122402	C -> G

4 METÓDY

4.1 Izolácia DNA

DNA bola izolovaná z bukálnych sterov pomocou kolóniek QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Kefka s bukálnym sterom bola uložená v 1,5 ml Eppendorfke a ponorená do 1 ml lyzačného roztoku. Zloženie a príprava lyzačného roztoku je uvedené v Prílohe 1.

Pracovný protokol izolácie DNA:

1. Pred začiatkom práce zapneme inkubačný box, aby sa nahrial na teplotu 60°C.
2. Eppendorfku s kefkou s bukálnym sterom je nutné 1 minútu vortexovať, aby sa od kefy uvoľnili prichytené bunky.
3. Následne odpipetujeme 200 µl roztoku a prenesieme do sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky.
4. Pridáme 1000 µl extrakčného PB pufru a znovu dôkladne zvortexujeme.
5. Necháme inkubovať s miešaním cca 200 otáčiek za minútu pri 60 °C 1 hod. Po inkubácii supernatant 1 minútu centrifugujeme pri 12 000 g.
6. Supernatant na dvakrát prenesieme do kolonky a scentrifugujeme (1,5 min, 12 000g).
7. Pridáme 200 µl extrakčného pufru PB a opäť všetko scentrifugujeme (1,5 min, 12 000g).
8. Potom pridáme 700 µl preplachovacieho pufru PE s etanolom a opäť sa to scentrifuguje (1,5 min, 12 000 g).
9. Kolónku vylejeme, osušíme okraje, scentrifugujeme (3 min, 12 000g) a necháme oschnúť v boxu v prievane cca 10 minút.
10. Vymeníme Eppendorfku, pridáme 40 µl elučného EB pufru. Necháme to inkubovať 5 minút a nakoniec to ešte raz scentrifugujeme (1,5 min, 12 000 g).
11. Kolónku vyhodíme a Eppendorfku s DNA dáme do mrazničky.

4.2 Gélová elektroforéza

Elektroforéza nám umožňuje separáciu nukleových kyselín na základe veľkosti. Princíp metódy je založený na vlastnosti nukleových kyselín, ktoré sú záporne nabité a preto v elektrickom poli putujú ku kladne nabitej elektróde. Nukleové kyseliny sa

v agarózovom géle pohybujú úmerne svojej dĺžke. Kratšie úseky migrujú rýchlejšie a dlhšie úseky migrujú pomalšie. Priebeh elektroforézy ovplyvňuje najmä koncentrácia gélu a veľkosť napätia. Na separáciu kratších úsekov sa zvyčajne využívajú vyššie koncentrácie agarózy a nižšie napätie. Zatiaľ čo pre dlhé úseky sa používa nižšia koncentrácia agarózy a beží pod vyšším napätím.

V rámci tejto práce sme používali 2% agarózový gél. Gélovú elektroforézu sme používali na kontrolu amplifikácie po prvej multiplex PCR reakcie a na optimalizáciu vstupného množstva produktov amplifikácie DNA pre fluorescenčné značenie.

Príprava 2% agarózového gélu:

1. V Erlenmayerovej banke si pripravíme roztok gélu zmiešaním 1,2 g práškovej agarózy, 12 g 5xTBE pufru a 48 g destilovanej vody.
2. Roztok varíme v mikrovlnnej rúre pokiaľ sa agaróza úplne nerozpustí (cca 1-1,5 min). Necháme pár krát previesť varom a necháme to schladnúť cca 10 min.
3. Do schladnutého gélu pridáme 4 μ l EtBr, ktorý sa inkorporuje do DNA a tým umožňuje vizualizáciu DNA pod UV svetlom. Etídium dôkladne v roztoku rozmiešame.
4. Zmes vylejeme do vaničky v ktorom je upevnený hrebeň a necháme to tuhnúť minimálne 30 minút.
5. Po stuhnutí gélu hrebeň opatrne vyberieme, aby sme nepoškodili vzniknuté jamky. Vyberiem vaničku, otočíme ju tak aby jamky boli nad červeným pruhom. Nalejeme 0,5xTBE pufru tak, aby pokrýval gél vrátane jamiek.
6. Na sterilný parafilm si napipetujeme nanášací pufr, ktorý spôsobuje klesanie vzorku na dno jamky v gélu a vďaka farbe aj kontrolu pri nanášaní jednotlivých vzoriek. V tejto práci bol využití Orange G (Chempol). 5 μ l vzorku sme zmiešali z 8 μ l farbičky. Do poslednej jamky v gélu sme dávali 5 μ l veľkostného markeru, ktorý bol pripravený z DNA bakteriofága lambda o koncentrácií 50 ng/ μ l (Fermentas).
7. Elektroforézu pripojíme k elektrickému zdroji na 70 v a necháme bežať 30 min.
8. DNA s inkorporovaním EtBr vizualizujeme UV transluminátorom. DNA s etídiom po ožiarení UV svetlom fluoreskuje oranžovým svetlom.

4.3 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je veľmi citlivou metódou, ktorá umožňuje detekciu a analýzu špecifických génových sekvencií, bez molekulárneho klonovania. PCR je enzymatická amplifikácia cieľovej sekvencie, ktorá je umiestnená medzi dvomi oligonukleotidovými primermi. Opakovaným 30 – 40 cykloch tepelnej denaturácie, hybridizácie primerov a enzýmovej syntézy majú za následok exponenciálne množenie cieľových sekvencií (Thompson et al., 2001).

Na PCR reakciu okrem DNA potrebujeme ešte pufr, $MgCl^{2+}$, vodu, primery (forward a reverz) a dNTP a DNA-polymerázu. Amplifikácia DNA prebieha v troch po sebe nasledujúcich teplotných cykloch, ktoré sa pravidelné opakujú a to: denaturácie, annealingu a extenzie. Pri denaturácii dochádza k disociácii fragmentov dsDNA na ssDNA, pri teplote zvyčajne 92 – 95 °C. Počiatočná denaturácia trvá 2 – 5 minút a každým nasledujúcim cyklo trvá 15 – 45 s. Po denaturácii nastupuje annealing, ktorý je kľúčovou fázou úspešnej PCR. Pri annealingu dochádza k špecifickému nasadeniu primerov na ssDNA vlákna. Teplota annealingu závisí na dĺžke a vlastnostiach primeru a T_m produktu. Teplota annealingu je spravidla o 5 °C nižšia ako je teplota T_m a pohybuje sa v rozpätí 45 – 68 °C. Doba annealingu je 15 – 60 s. Posledným krokom je extenzia, pri ktorej dochádza k syntéze nových reťazcov DNA, ktoré sa viažu na 3' koniec primeru. Extenzia prebieha pri teplote 68 – 75 °C a dobou trvania 30 – 90 s, ktorá závisí na dĺžke fragmentu. Najčastejšie extenzia prebieha pri 72 °C, čo je optimálna teplota Taq polymerázy. Finálnou extenziou, ktorá trvá 5 minút, vylúčime výskyt krátkych fragmentov.

V tejto práci sme využívali modifikáciu klasickej PCR a to multiplex PCR. Výhodou multiplex PCR je že v rámci jedného cyklu amplifikuje viacero lokusov súčasne v jedinej mikroskúmavke. Tým sa skracuje čas potrebný na amplifikáciu všetkých lokus a znižuje sa aj riziko kontaminácie.

4.4 Technológia LabMAP Luminex

V súčasnosti je dostupná celá rada moderných technológií, ktoré umožňujú študovať genóm, medzi ne patria aj tzv. biočipy. Na trhu je dostupné množstvo rozličných čipov, ktoré sa využívajú na rôzne aplikácie v molekulárnej biológii. Jednu z univerzálnych a veľmi výkonných čipových technológií predstavuje LabMAP Luminex System (Luminex MultiAnalyte Profiling Technology), ktorá bola použitá aj v rámci tejto štúdie. Táto technológia patrí medzi tzv. guľôčkové mikročipy (bead arrays) a využíva sa

na kvantitatívne ale i kvalitatívne analýzy nukleových kyselín a proteínov. Zaujímavosťou technológie Luminex je, že ako nosiče sond využíva polystyrénové mikrosféry o priemeru 5,6 μm .

Sondy (oligonukleotidy, protilátky) sú kovalentne ukotvené na povrchu mikrosfér, ktorý je modifikovaný COOH- alebo avidínom. V závislosti na typu použitých mikrosfér sú sondy na 5'- konci modifikované aminoskupinou (u karboxylovaných mikrosfér) alebo biotínom (u avidinových mikrosfér). Na doporučení od výrobcu by sa dĺžka naviazaných oligonukleotidových sond mala pohybovať v rozpätí 18-24 nukleotidov. Sondy by mali byť navrhované tak aby obsahovali jedinečné sekvencie bez homológií a repetícií, aby sa minimalizovala nešpecifická hybridizácia. Množstvo naviazovaných sond sa môže pohybovať od 1-20 nmol. Dĺžka hybridizovaných úsekov by nemala presiahnuť 300 bp. Kvôli optimálnej hybridizácii by mali byť sondy navrhnuté tak aby boli komplementárne k úseku uprostred fragmentu (www.luminexcorp.com).

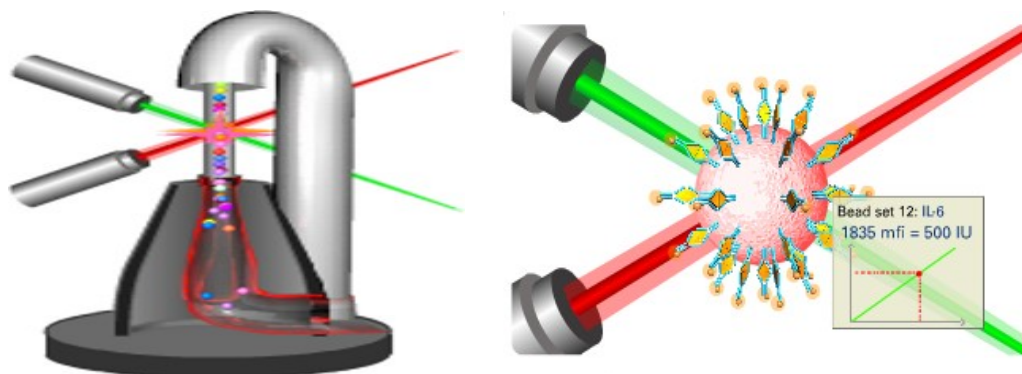
Mikrosféry sú interne fluorescenčné značené. V Luminex systéme je dostupných sto sád s odlišnou fluorescenciou čo je docielené zmiešaním rôznych pomerov dvoch fluorescenčných farbičiek. A preto má každý set mikrosfér charakteristickú fluorescenciu, vďaka ktorej je pri prechode lasermi identifikovaný. A preto tento systém umožňuje v rámci jedného vzorku detegovať 100 rôznych génov alebo proteínov. Na značenie vzorkou sa využívajú fluorescenčné farbičky s emisnou vlnovou dĺžkou 560-590 nm. Prevažná časť protokolov využíva farbičku phycoerytrin, pretože poskytuje veľmi silný signál. Alternatívnymi farbičkami sú Alexa alebo Cy3 (www.luminexcorp.com).

Vlastná analýza mikrosfér je dvojstupňová. Ide tu vlastne o detekciu fluorescencie. Mikrosféry s naviazanou vzorkou pretekajú detekčným kanálom, cez ktorý prebiehajú dva laserové lúče. Pomocou laserových lúčov je snímaná fluorescencia vo vnútri mikrosfér (identifikácia mikrosfér) a na ich povrchu (meranie fluorescencie naviazaného vzorku).

V rámci každej sady mikrosfér, ktoré nesú určitú sondu je meraných niekoľko desiatok guľôčiek a výsledná hodnota fluorescencie je vypočítaná ako priemerná hodnota všetkých meraní v danom sete (www.luminexcorp.com).

Na základe publikácií je technológia Luminex využívaná predovšetkým na štúdium proteínov. Prevažná väčšina štúdií a diagnostických testov je zameraná na detekciu cytokínov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v hematopoézií. Okrem cytokínov sú študované aj ďalšie proteíny, ako sú rastové faktory, kinázy, hormóny, vírusové a bakteriálne proteíny a mnohé ďalšie. V genomike je táto technológia využívaná hlavne na detekciu SNP polymorfizmov. Kity pre toto využitie technológie vyrába firma Marligen, ktorá ponúka

sety na detekciu polymorfizmov na chromozóme Y a mitochondriálnej DNA. Technológia Luminex sa využíva taktiež na typizáciu veľmi polymorfného HLA systému. Aj samotná firma Luminex taktiež vypracovala protokoly pre detekciu mutácií génov pre cystickú fibrózu a faktor V (Bruchová et al., 2005).



Obr. 13. Detekcia polymorfizmov prístrojom Luminex (www.luminexcorp.com).

4.5 Pracovný protokol na analýzu SNPs chromozómu Y

4.5.1 Použité prístroje a materiál

Signet Y-SNP Identification systém v2.0:

Y-SNP Genotyping Core Kit, kat.č. 11710-100, Marligen biosciences

Y-SNP Primary Screening Kit. kat. č. 11711-100, Marligen biosciences

Y-SNP E Genotyping Kit. kat. č. 11714-100, Marligen biosciences

Platinum Taq DNA polymerase (5U/μl), kat. č. 10966-034, Invitrogen

Izolačný kit- QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN

PCR cykler s vyhrievaním vrchom, Eppendorf

Gélová elektroforéza

Vodný sonikátor Teson

Vortex

Luminex 100 System

mikroskúmavky, špičky,

mikrotitračné doštičky

pipety, stojánky

rukavice

4.5.2 Amplifikácia Y-chromozómovej DNA

1. Y-SNP PCR zmesi je nutné pred každým použitím 5-10 s poriadne zvortexovať.
2. Podľa Tab. 7 si do 1,5 ml skúmavky pripravíme Master Mix na PCR reakciu.

Tab. 7. Zastúpenie jednotlivých zložiek Master Mixu potrebných na amplifikáciu Y- chromozómovej DNA

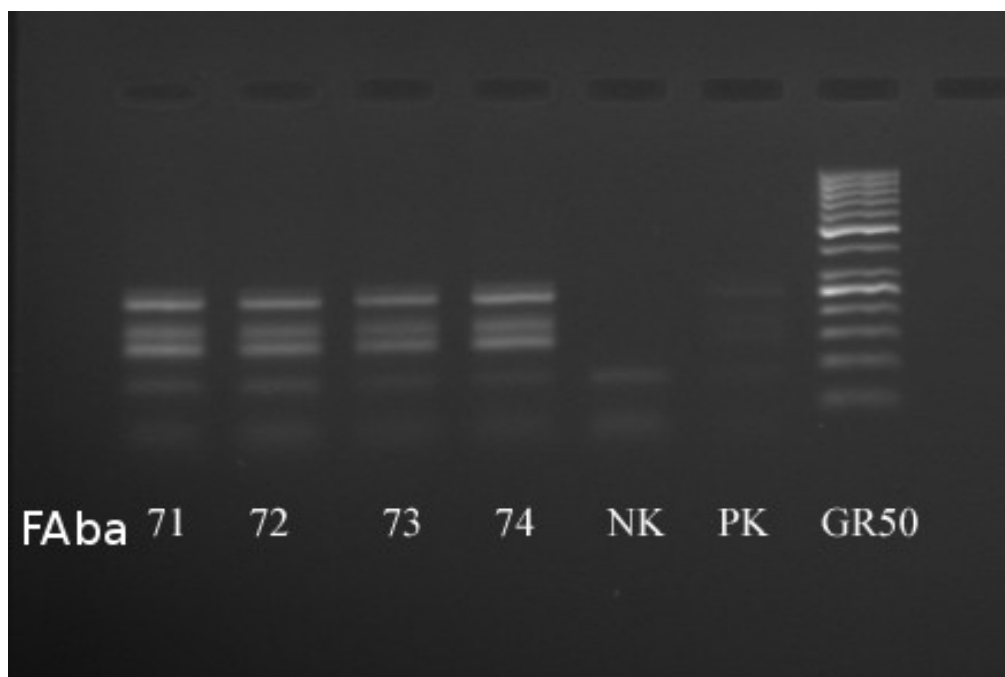
Zložky	Množstvo na jednu reakciu
Y-SNP PCR Mix	5 μl
Platinum Tag DNA polymerase (5U/ μ l)	0,2 μl
Kontrolná/testovaná DNA	1-10 ng
Deionizovaná voda	doplniť do 10 μl

3. Amplifikácia DNA prebieha v termocykleri s vyhrievaním vekom (Eppendorf) podľa podmienok uvedených v Tab. 8. Po amplifikácii je možné vzorky uchovávať pri teplote -20 °C rôzne dlhú dobu.

Tab. 8. Reakčné podmienky amplifikácie Y-chromozómovej DNA

	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	94°C	5 min
Amplifikácia (30 cyklov)	94°C	30 s
	58°C	20 s
	72°C	90 s
Konečná extenzia	72°C	3 min

4. Pre kontrolu amplifikácie je vhodné spraviť gélovú elektroforézu.
5. Vzorky sú následne inkubované s 0,25 μ l Exonukleázy I (2U/ μ l) v termocykleri s vyhrievaním vekom (Eppendorf). Samostatná inkubácia je pri 37 °C 30 minút a potom nasleduje inaktivácia enzýmu pri 80 °C 20 minút.



Obr. 14. Kontrola amplifikácie PCR využitím 2% gélu: FAba- subpopulácia Fulbov s oblasti Abalak, NK- negatívna kontrola, PK- pozitívna kontrola, bp- bázoové páry, GR50- veľkostný marker (Fermentas).

4.5.3 Fluorescenčné značenie amplifikovanej DNA

Pri fluorescenčnom značení dochádza počas ďalšej PCR reakcie k inkorporácii fluorescenčnej značky do amplifikovaných fragmentov DNA. Pre všetky multiplexy sa používa rovnaký značiaci Y-SNP Labeling Mix roztok. Značiaci roztok je citlivý na svetlo a preto ho musíme chrániť pred priamym svetlom.

1. Značiace roztoky je nutné pred použitím dôkladne 5-10 s zvortexovať.
2. Podľa nasledujúcej tabuľky Tab. 9 si pripravíme Master Mix pre jednotlivé PCR reakcie.

Tab. 9. Pomerne zastúpenie jednotlivých zložiek Master Mixu na fluorescenčné značenie produktov PCR

Zložky	Množstvo na jednu reakciu
Y-SNP Labeling Mix	2,5 µl
Platinum Tag DNA polymerase (5U/µl)	0,125 µl
Amplifikovaná DNA	podľa potreby (obvykle 0,5-1 µl)
Deionizovaná voda	doplniť do 12,5 µl

3. Fluorescenčné značenie produktov PCR prebieha v termocykleri s vyhrievaním vekom (Eppendorf) podľa značiaceho programu uvedeného v Tab. 10. Takto naznačenú amplifikovanú DNA chránime pred priamym slnečným žiarením a uchováваме pri teplote -20 °C.

Tab. 10. Reakčné podmienky fluorescenčného značenia produktov PCR

	Teplota	Čas
Počiatková denaturácia	94°C	5 min
Amplifikácia (30 cyklov)	94°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	30 s
Konečná extenzia	72°C	3 min

4.5.4 Alelicky špecifická hybridizácia

Fluorescenčne značené produkty následne hybridizujeme s mikrosférami, ktoré sú taktiež fluorescenčne naznačené. A preto ich musíme chrániť pred priamym slnečným žiarením. Aspoň 30 min pred analýzou je potrebné zapnúť prístroj Luminex. Prepláchnuť ho sheat pufrom a etanolom a zapnúť vyhrievanie XY jednotky na 55°C.

1. Do jamiek mikrotitračnej doštičky napipetujeme 17,5 µl hybridizačného roztoku. Začínáme od A1 a pokračujeme až na H1, potom pokračujeme na A2-H2 a postupne stĺpec po stĺpci.
2. Do jamiek s hybridizačným roztokom napipetujeme fluorescenčne značené PCR produkty a doštičku vložíme do nahriatej XY jednotky Luminexu, pokiaľ si pripravíme Hybridizačný bead Mix.
3. Zmesi mikrosfér je pred použitím nutné zvortexovať po dobu 15-20 s. Aby sa jednotlivé mikrosféry od seba oddelili, potom ich 2 min sonikujeme vo vodnom sonikátore (Teson).
4. Pripravíme si master mix: na 1 jednu vzorku dáme 1µl suspendovaných mikrosfér a 17,5 µl hybridizačného roztoku. Zmes sa opäť 15-20s vortexuje a 1 min sonikuje.
5. Ku každému vzorku v doštičke pridáme 18,5 µl master mixu a vzorky potom hybridizujeme s mikrosférami pri 55 °C 30 min.

4.5.5 Detekcia Y-SNPs pomocou prístroja Luminex 100

Analýzu Y-SNP polymorfizmov je nutné prevádzať ihneď po ukončení hybridizácie, pretože výrobca kitu predpisuje optimálnu teplotu potrebnú na analýzu 55°C. Vyhodnotenie jedného vzorku trvá približne 30 sekúnd. Výrobca kitu odporúča na analýzu parametre, ktoré sú uvedené v Tab. 11.

Tab. 11. Parametre prístroja LabMAP Luminex 100 pre analýzu Y-SNPs

Parameter	Predpísaná hodnota
Teplota	55°C
Testovaný objem vzorku	35 µl
Minimálny počet testovaných mikrosfér	20
Rýchlosť analýzy	vysoká

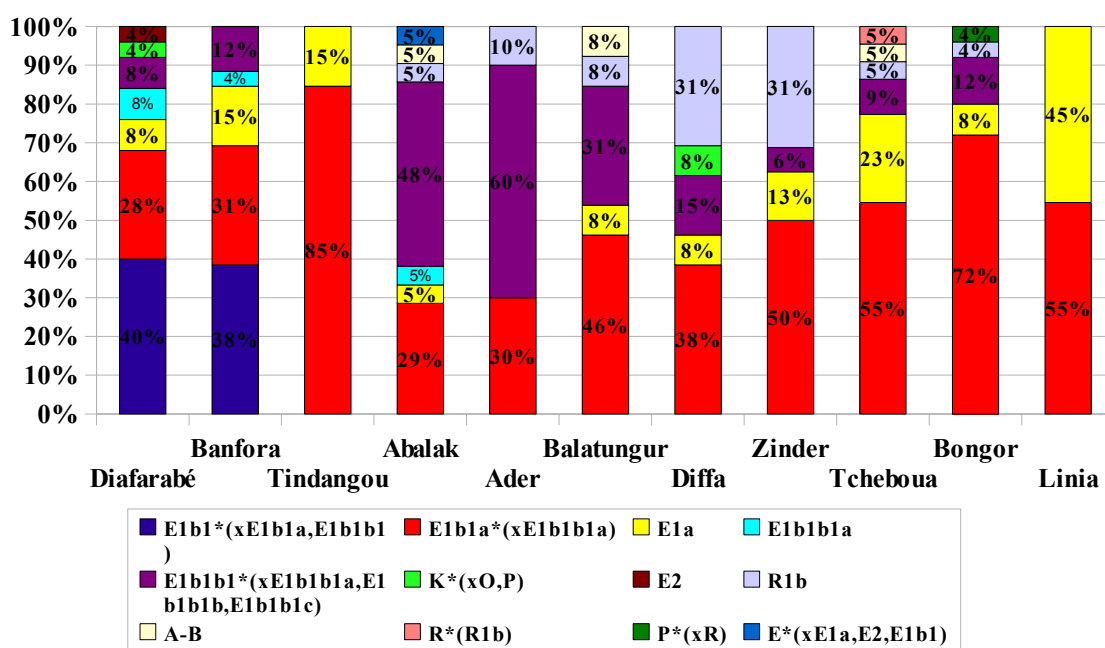
5 VÝSLEDKY

5.1 Haploskupiny a ich frekvencie výskytu

Z celkového počtu haploskupín, ktoré môžeme detegovať prostredníctvom využitého kitu sme v 205 vzorkách DNA Fulbov zistili 12 rôznych haploskupín. V subsaharskej Afrike väčšina haplotypov zdieľa ancestrálnu alelu na lókuse M89. Do typicky africkej haploskupiny E, ktorá je definovaná polymorfizmom M96 patrí 89,3% analyzovaných nomádskych jedincov subsaharskej populácie Fulbov.

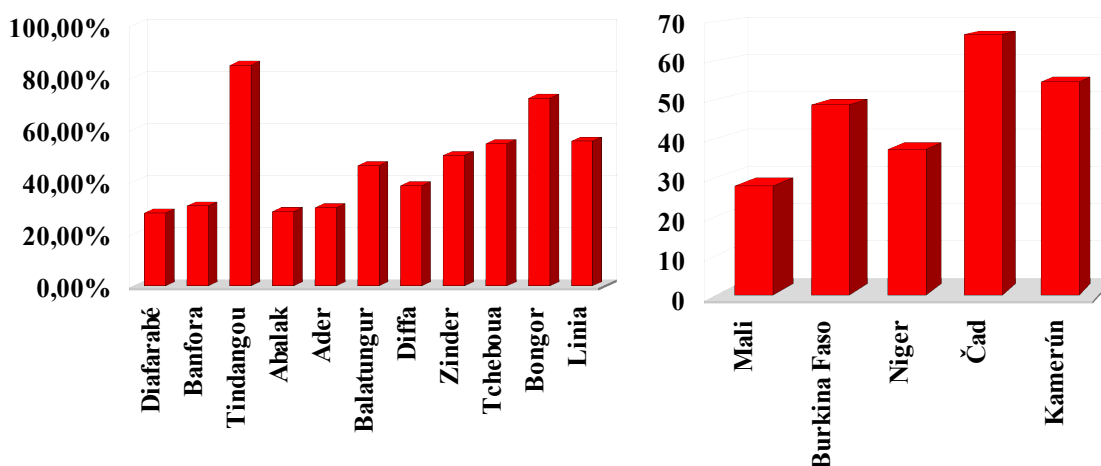
Jedinou haploskupinou, ktorá sa vyskytovala vo všetkých 11 subpopuláciách Fulbov bola paraskupina E1b1a*(x E1b1a1), ktorú zdieľa takmer polovica populácie Fulbov.

Šesť haploskupín dosiahlo hranicu výskytu vyššiu ako sú 2%. V žiadnej zo subpopulácií neboli detegované všetky dvanásť haploskupín. V jednej subpopulácii sme najviac detegovali 7 rôznych haploskupín a to v subpopuláciách z oblasti Diafarabé a Abalak. V subpopuláciách oblasti Tindangou a Linia boli zase zistené iba dve haploskupiny. Čo môže byť čiastočne spôsobené aj relatívne malým počtom analyzovaných jedincov v daných populáciách. V subpopulácii z oblasti Tcheboua bolo detegovaných 6 rôznych haploskupín. Po päť rôznych haploskupín bolo zistených v subpopuláciách z oblasti Bongor, Balatungur, Diffa a Banfora. Štyri rôzne haploskupiny boli nájdené v subpopulácii z oblasti Zinder. V subpopulácii z oblasti Ader boli zistené 3 rôzne haploskupiny. Kompletné výsledky frekvencie výskytu jednotlivých haploskupín v jednotlivých subpopuláciách je uvedená nižšie na Obr. 15 a na Grafe 1.



Graf 1. Percentuálne zastúpenie haploskupín v jednotlivých subpopuláciách Fulbov.

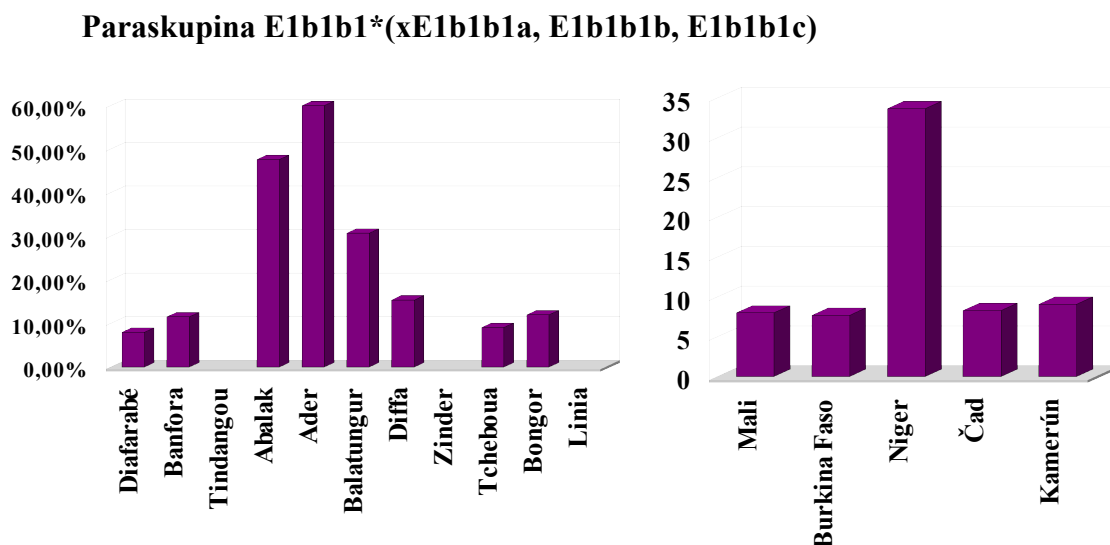
Paraskupina E1b1a*(x E1b1a1)



Graf 2. Zastúpenie paraskupiny E1b1a*(x E1b1a1) v populáciách Fulbov.

Najčastejšie sa vyskytujúcou haploskupinou v populáciách Fulbov bola paraskupina E1b1a*(E1b1a1), ktorá je definovaná polymorfizmom M2*. Tento polymorfizmus sa vyskytuje vo všetkých analyzovaných subpopuláciách Fulbov. Z 205 vzoriek bol detegovaný 93 krát, čo predstavuje frekvenciu výskytu u sledovaného súboru Fulbov 45,37%. Najvyššiu frekvenciu výskytu polymorfizmu M2* sme zaznamenali v Čade, kde sa vyskytuje vo frekvencii 66,7%. Najnižší výskyt sme zaznamenali v Mali, kde sa vyskytuje vo frekvencii len 28%. V Nigeri bol zistený u 37,3% jedincov. V Kamerune zdieľa túto paraskupinu 54,6% Fulbov a v Burkine Faso sme ju zistili u 48,7% jedincov.

Frekvencie výskytu polymorfizmu M2* sa v jednotlivých subpopuláciách výrazne líšili. Najväčšie zastúpenie mal tento polymorfizmus v subpopulácii z oblasti Tindangou, kde sa vyskytuje s frekvenciou až 84,6%. Pomerne vysoký výskyt tejto paraskupiny definovanej polymorfizmom M2* bol zistený aj v subpopulácii z oblasti Bongor, kde dosiahla hranicu výskytu 72%. 50% hranicu výskytu dosiahla v subpopuláciách z oblasti Linia a Tcheboua. Najmenší výskyt sme zaznamenali u subpopuláciách z oblasti Abalak, Ader a Banfora, kde sa vyskytovala vo frekvencii len okolo 30%.

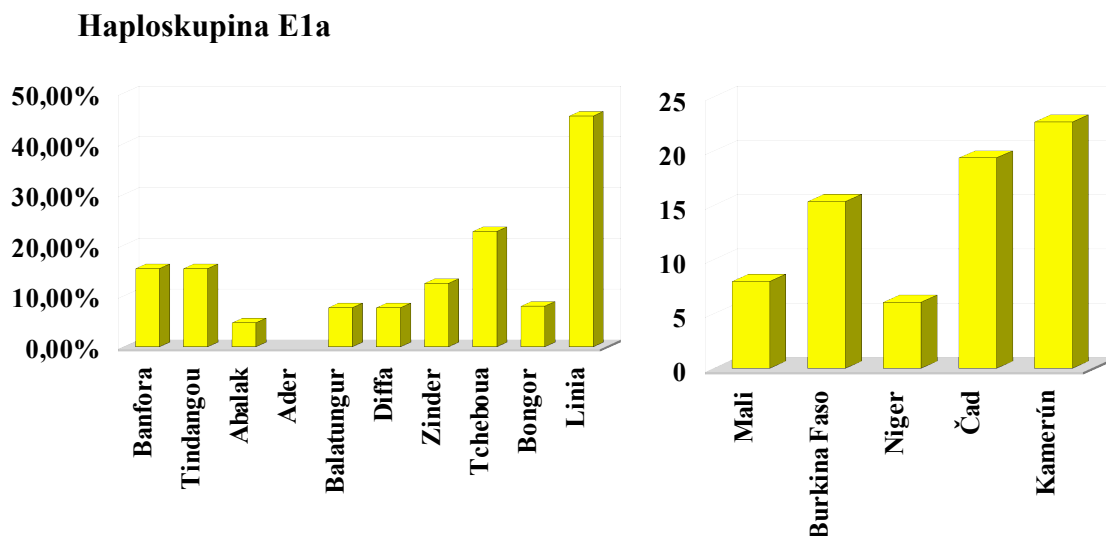


Graf 3. Percentuálny zastúpenie paraskupiny E1b1b1*(x E1b1b1a,E1b1b1b, E1b1b1c) v jednotlivých subpopuláciách Fulbov.

Druhou najčastejšie sa vyskytujúcou haploskupinou u sledovanej populácie Fulbov bola paraskupina E1b1b1*(xE1b1b1a,E1b1b1b,E1b1b1c), ktorá je definovaná polymorfizmom M35*. Mutácia G na C v polymorfizme M35 definuje vetvu E1b1b1. Haploskupina E1b1b1 sa pomocou ďalších polymorfizmov ďalej vetví. Mutácia C na T v polymorfizme M78 definuje haploskupinu E1b1b1a, mutácia C na T v polymorfizme M81 určuje haploskupinu E1b1b1b a mutácia G na A v polymorfizme M123 nám definuje haploskupinu E1b1b1c. Okrem toho sa tu ešte zaraďuje paraskupina E1b1b1*(E1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c).

S celkového počtu jedincov sa vyskytla u 38 jedincov, čo predstavuje 18,5% z celkového počtu. Paraskupina E1b1b1*(xE1b1b1a,E1b1b1b,E1b1b1c) sa z najvyššou frekvenciou vyskytuje v Nigeri, kde sme ju zistili u 33,7% jedincov. V ostatných štátoch sa tento polymorfizmus vyskytuje v približne rovnakej frekvencii. Tento polymorfizmus nebol zistený v subpopuláciách z oblasti Tindangou Zinder a Linia. Najvyšší výskyt bol zaznamenaný v subpopulácii z oblasti Ader, kde dosiahol 60,0%. V 47,6% sa vyskytoval

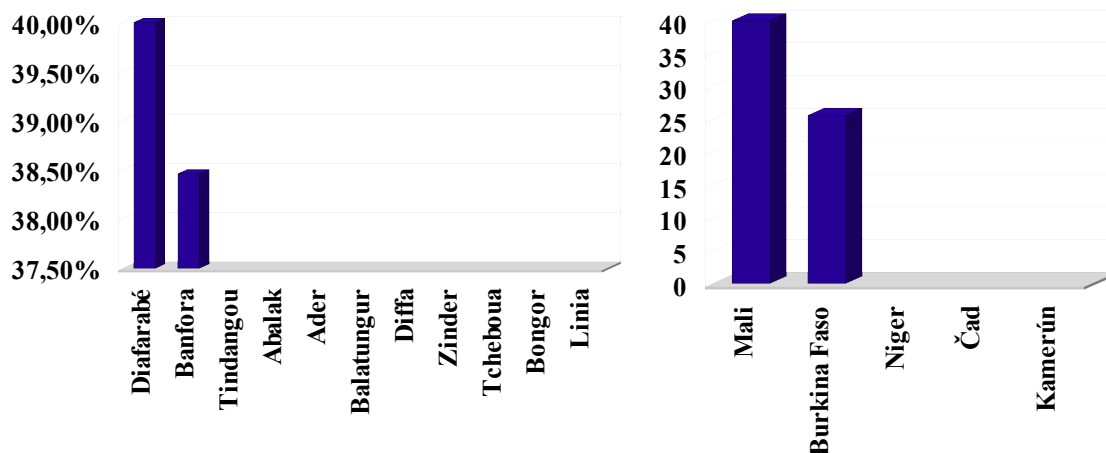
v subpopulácií z oblasti Abalak. V subpopulácií z oblasti Balatungur hranica výskytu haploskupiny dosiahla 30,00%. 10,00% hranicu výskytu sme zaznamenali v subpopuláciách z oblasti Banfora a Diffa a Bongor. V menej ako 10% sa vyskytuje v subpopuláciách z oblasti Diafarabé a Tcheboua.



Graf 4. Zastúpenie haploskupiny E1a v subpopuláciách Fulbov.

V poradí tretou najčastejšou haploskupinou bola haploskupina E1a. Haploskupinu E1a definuje prítomnosť odvodenej alely C v polymorfizme M33. Jej frekvencia výskytu u sledovaných subpopulácií je 12,2%. Najvyšší výskyt tejto haploskupiny bol zaznamenaný v Kamerune, kde sa vyskytuje u 22,7% jedincov. V Čade sme ju zistili u 19,4% jedincov. V Burkine Faso ju zdieľa 15,4% jedincov a v Mali 8% jedincov. V najnižšej frekvencii sa vyskytuje v Nigeri, kde bola zistená iba u 6% Fulbov. Polymorfizmus M33, ktorý definuje haploskupinu E1a sme nedetegovali iba v subpopulácií z oblasti Ader. Menej než 5% výskyt má v subpopulácií z oblasti Abalak. 10% hranicu výskytu nedosiahli subpopulácie z oblasti Balatungur, Diffa a Bongor. Najvyšší až 45,4% výskyt sme zaznamenali v subpopulácií z oblasti Linia. 22,7% výskyt bol zaznamenaný v subpopulácií z oblasti Tcheboua. V subpopuláciách z oblasti Banfora a Tindangou sa výskyt haploskupiny E1a pohyboval okolo 15%.

Paraskupina E1b1*(x E1b1a, E1b1b1)

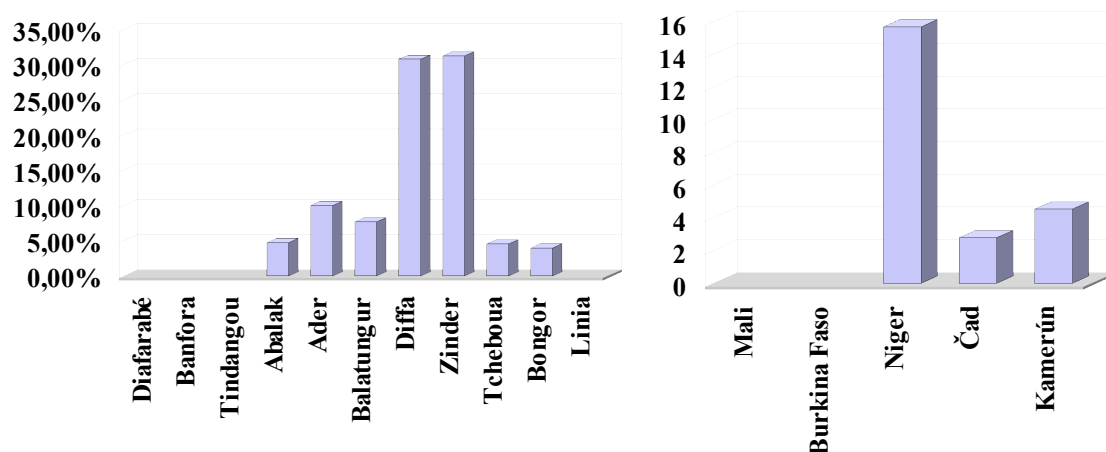


Graf 5. Zastúpenie paraskupiny E1b1*(x E1b1a, E1b1b1) v subpopuláciách Fulbov.

V poradí štvrtou najčastejšie sa vyskytujúcou sa haploskupinou bola paraskupina E1b1*(x E1b1a, E1b1b1). Mutácia v polymorfizme DYS391 určuje vetvu E1b1. Pri mutácií dochádza k zámene C na G.

Táto haploskupina bola detegovaná v 20 prípadoch, čo predstavuje 9,76% s celkového počtu. Výskyt paraskupiny E1b1*(x E1b1a, E1b1b1) bol zaznamenaný iba v Mali a v Burkine Faso a to iba v dvoch subpopuláciách. Najvyšší výskyt bol u subpopulácie z oblasti Diafarabé v Mali, kde dosiahol 40%. V Burkine Faso sme túto paraskupinu zistili iba v oblasti Banfora, kde sa vyskytuje vo frekvencii 38,5%. V ostatných subpopuláciách nebola detegovaná.

Haploskupina R1b



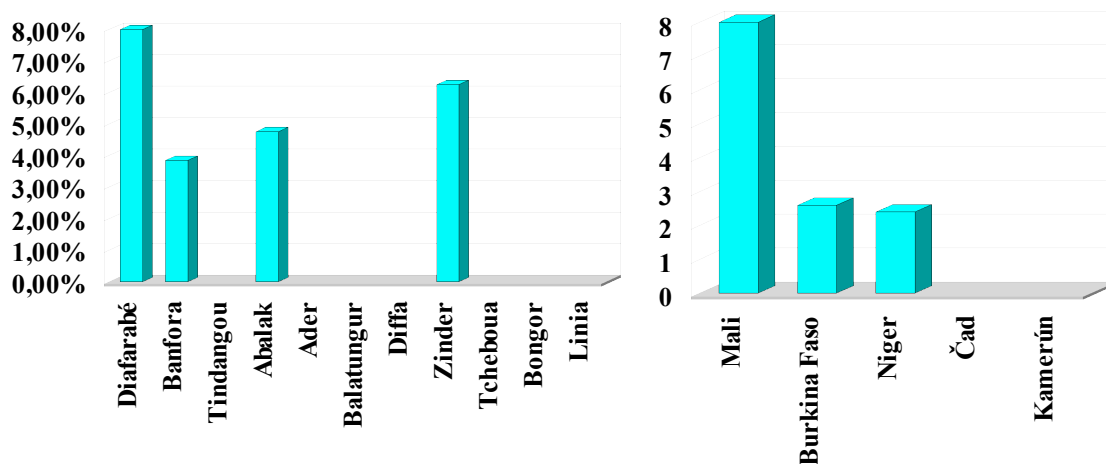
Graf 6. Zastúpenie haploskupiny R1b v jednotlivých subpopuláciách Fulbov.

Piatou najčastejšou haploskupinou bola haploskupina R1b. Haploskupina R je

definovaná prítomnosťou odvodenej alely G v polymorfizme M207. Haploskupinu R môžeme ešte rozdeliť na paraskupinu R* (xR1b) a haploskupinu R1a, R1b a R2. R1b haploskupina je definovaná mutáciou v polymorfizme M343, ktorá spočíva v zámene C na A.

Aj keď haploskupina R1b patrí medzi eurázijské haploskupiny, tak z 205 skúmaných jedincov je nositeľom tejto typický eurázijskej haploskupiny 15 jedincov, čo predstavuje frekvenciu výskytu 7,3%. Najväčšie zastúpenie tejto eurázijskej haploskupiny sme zaznamenali v Nigeri, kde sa vyskytuje vo frekvencii 15,7%. Západne od Nigeru sme túto haploskupinu nedetegovali a východne od Nigeru sa vyskytuje iba v nízkej frekvencii. V Čade bola zistená u 2,8% jedincov a v Kamerune u 4,6% jedincov. Pomerne veľké zastúpenie haploskupiny R1b sme zistili v subpopuláciách z oblasti Diffa a Zinder, kde frekvencia výskytu presiahla 30%. Nad 5% hranicu výskytu bola detegovaná v subpopuláciách Balatungur a Ader. V subpopuláciách z oblasti Abalak, Tcheboua a Bongor nedosiahla ani 5% hranicu výskytu. Haploskupina R1b nebola zistená v subpopuláciách z oblasti Diafarabé, Banfora, Tindangou a Linia.

Haploskupina E1b1b1a



Graf 7. Zastúpenie haploskupiny E1b1b1a v jednotlivých subpopuláciách Fulbov.

Haploskupina E1b1b1a sa v sledovanej vzorke populácie Fulbov vyskytla vo frekvencii 2,44%. Haploskupinu E1b1b1a definuje mutácia v polymorfizme M78. Najväčšie zastúpenie tohto polymorfizmu sme zistili u Fulboch pochádzajúcich z Mali, kde sa vyskytuje u 8% jedincov. Smerom na východ od Mali postupne klesá frekvencia výskytu polymorfizmu a v Čade ani Kamerune nebol v populácii Fulbov zistený. Táto haploskupina, ktorá je definovaná polymorfizmom M78, bola zistená v štyroch

subpopuláciách. Najvyššiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali v subpopulácií z oblasti Diafarabé, kde frekvencia výskytu dosiahla 8.0%. V 6,3% frekvencii sa vyskytuje v subpopulácií z oblasti Zinder. Menej ako 5% výskyt tejto haploskupiny sme zaznamenali v subpopuláciách z oblasti Banfora a Abalak.

Ostatné haploskupiny

Medzi ostatné haploskupiny, ktoré nedosiahli hranicu výskytu väčšiu ako 2% patria haploskupiny AB (1,46%). Haploskupiny AB sú určená prítomnosťou pôvodnej alely v polymorfizme M168. Ďalej je to paraskupina E*(xE1a,E2,E1b1) (0,49%) a haploskupina E2 (0,49%). Haploskupinu E, určuje odvodená alela v polymorfizme M96. Haploskupina E2 je definovaná prostredníctvom zámeny G na A v polymorfizme M75.

Vetva F-R je určená mutáciou C na T v polymorfizme M89. Vetva K – R sa ďalšími mutáciami rozvetvuje na ďalšie tri vetvy. Mutácia v polymorfizme M175 určuje haploskupinu O. Mutácia G na A v polymorfizme M45 určuje haploskupinu P. Taktiež tu je zaradená paraskupina K*(xO,P). Paraskupina K*(xO,P) sa vyskytla u 0,98% jedincov. Paraskupina P*(xR) bola zistená u 0,49% jedincov a paraskupina R*(xR1b) taktiež u 0,49% jedincov.

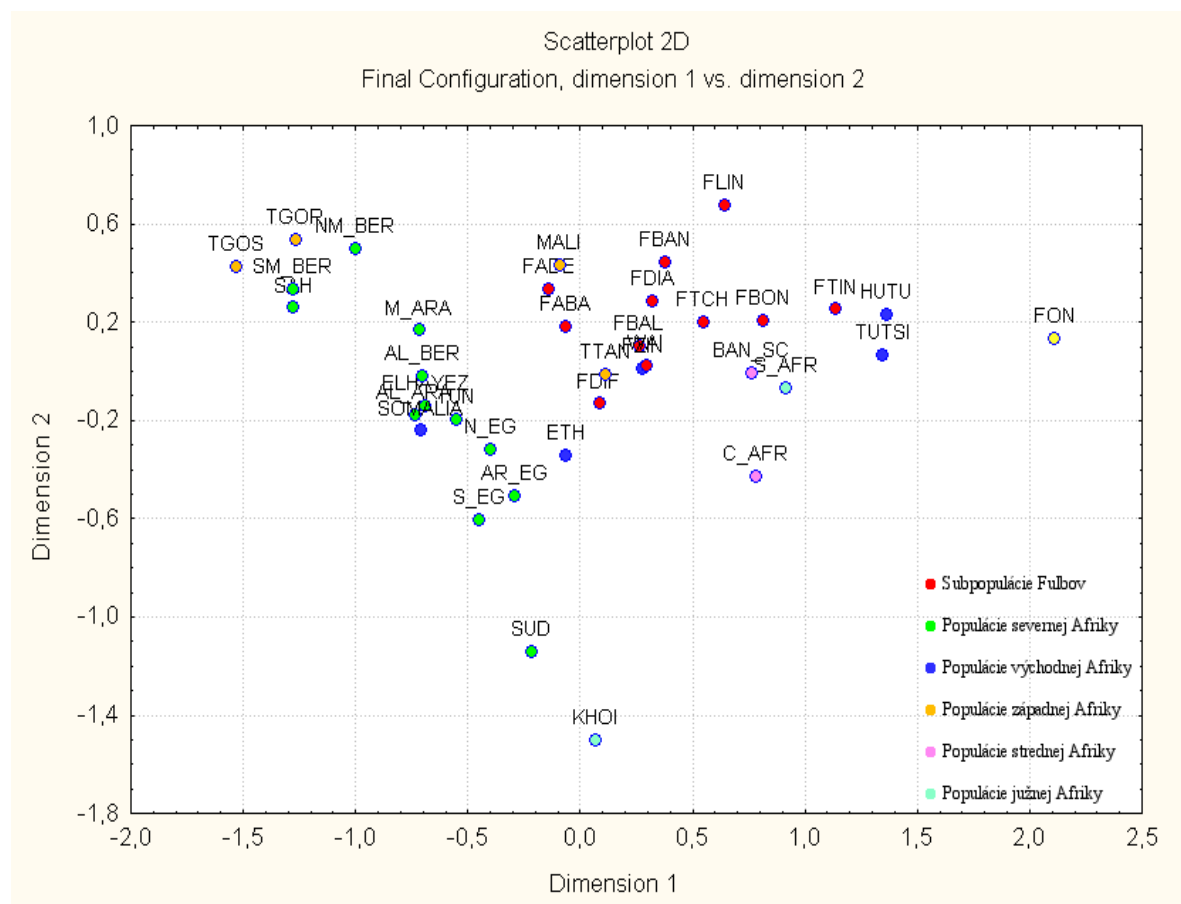
Haploskupina AB bola detegovaná v subpopuláciách z oblasti Tchiboua, Abalak a Balatungur, v každej s populácií bol zaznamenaný jeden výskyt. Paraskupinu E*(xE1a, E2,E1b1) sme zistili iba v subpopulácií z oblasti Abalak. Výskyt haploskupiny E2 (0,49%) bol zistený v subpopulácií z oblasti Diafarabé. Výskyt paraskupiny K*(xO,P) sme zistili v subpopuláciách z oblasti Diafarabé a Diffa. Jediný výskyt paraskupiny P*(xR) bola detegovaný v subpopulácií z oblasti Bongor. Paraskupina R*(xR1b) bola detegovaná iba v subpopulácií z oblasti Tchiboua v jedinom prípade.

5.2 Fst analýza

Fst analýzou, ktorá bola prevedená pomocou programu Arlequin 3.1.1, sme zisťovali genetické vzdialenosti jednotlivých populácií. Kompletné výsledky Fst analýzy sú uvedené v Prílohe 2. Genetická vzdialenosť sa využíva na určenie miery globálnej genetickej vzdialenosti medzi dvomi populáciami. Z Fst hodnôt bol následne zostavený MDS (multidimensional scaling) graf pomocou štatistického programu Statistika 6.

Jednotlivé subpopulácie Fulbov na základe Fst analýzy vykazujú určitý vzťah

s populáciami západnej a rovnako aj východnej Afriky. Na Grafe 8 môžeme vidieť, že subpopulácia Fulbov pochádzajúca z oblasti Tindangou z Burkiny Faso má najbližší vzťah k populáciám Hutu a Tutsi, ktoré pochádzajú z Rwandy a Burundi vo východnej Afrike. Subpopulácie Ader a Abalak z Nigeru sa najviac približuje obyvateľstvu Mali. Subpopulácií Fulbov pochádzajúcich z oblasti Diffa je najbližšia populácií Tuarégov z Nigeru. Subpopulácie z oblasti Zinder a Balatungur z Nigeru sú v tesnom vzťahu s populáciou Wairak z Tanzánie. Populácia Bantu so severného Kamerunu sa najviac približuje subpopulácii Fulbov z oblasti Tcheboua (Kamerun) a z oblasti Bongor (Čad).



Graf 8. MDS plot Fst genetických vzdialeností.

Tab. 12. Výsledky Fst analýzy jednotlivých subpopulácií Fulbov

	FDia	FBan	FTin	FAba	FAde	FBal	FDif	FZin	FTch	FBon
Diafarabé	0,00000									
Banfora	-0,02792	0,00000								
Tindangou	0,21954	0,22620	0,00000							
Abalak	0,04741	0,07119	0,27808	0,00000						
Ader	0,09502	0,12655	0,30195	-0,03675	0,00000					
Balatungur	0,00266	0,01879	0,11786	-0,01947	-0,00462	0,00000				
Diffa	0,19657	0,24124	0,26503	0,15986	0,12824	0,05982	0,00000			
Zinder	0,16925	0,20273	0,19039	0,16077	0,14007	0,04773	0,06190	0,00000		
Tcheboua	0,03701	0,03506	0,03765	0,09066	0,11440	0,02638	0,09111	0,05476	0,00000	
Bongor	0,09944	0,10620	-0,00611	0,14267	0,15970	0,00497	0,16178	0,11017	-0,00980	0,00000
Linia	0,11716	0,08773	0,12368	0,20504	0,24466	0,07947	0,21189	0,15579	-0,00498	0,07792

$p < 0,05$; červenou farbou sú označené štatisticky významne rozdiely

Fst analýzou, ktorej čiastočné výsledky sú uvedené v Tab. 12, sme zistili, že subpopulácia Diafarabé s Mali sa štatisticky významne nelíši od populácií nigerských subpopulácií z oblasti Balatungur a Abalak, kamerunskej oblasti Tcheboua a burkinskej oblasti Banfora.

Subpopulácie Fulbov z Burkiny Faso (Banfora, Tindangou) sa štatisticky významne líšia od nigerských subpopulácií z oblasti Abalak, Ader, Diffa. Subpopulácia Banfora sa okrem toho ešte významne líši od subpopulácií z oblasti Zinder a Bongor. Subpopulácia z Tindangou sa ešte štatisticky významne odlišuje od subpopulácie z oblasti Balatungur. Obidve subpopulácie z Burkiny sa taktiež medzi sebou vykazujú významne odlišnosti.

Nigerská subpopulácia Abalak sa štatisticky významne nelíši iba od populácií Diafarabé, Ader a Balatungur. S ostatnými populáciami na základe Fst analýzy vykazujú významne štatistické rozdiely. Subpopulácia z oblasti Ader z Nigeru sa významne nelíši iba od dvoch nigerských populácií a to iba od populácie Abalak a Balatungur. Ostatné subpopulácie pochádzajúce z Mali, Kamerunu, Čadu a Burkiny Faso sa významne štatisticky líšia od subpopulácie z Aderu. Subpopulácia Diffa z východného Nigeru sa významne štatisticky neodlišuje iba od subpopulácie z oblasti Zinder, Balatungur a Tcheboua. S ostatnými fulbskými populáciami vykazujú na základe FST analýzy štatisticky významné rozdiely. Subpopulácia Zinder sa štatisticky významne nelíši od populácií Tindangou, Balatungur, Diffa, Tcheboua a Linia.

Signifikantné rozdiely boli zistené aj medzi subpopuláciou Tcheboua so severného Kamerunu a nigerskými subpopuláciami Abalak a Ader. S ostatnými fulbskými populáciami

nebola na základe analýz genetickej vzdialenosti zistená odlišnosť.

Čadské subpopulácie z oblasti Bongor a Linia sa signifikantne líšia od subpopulácie z oblasti Diafarabé, Abalak, Ader a Diffa. Subpopulácia z Bongoru sa ešte okrem toho líši aj od populácie Fulbov žijúcej v oblasti Banfora a Zinder. Aj jednotlivé čadské populácie sa medzi sebou významne štatisticky líšia.

Porovnaním jednotlivých subpopulácií Fulbov s ďalšími populáciami Afriky sme zistili, že populácia Fulbov sa významne líši od väčšiny porovnávaných afrických populácií. Najmenej sa líšia od populácie Bantu. Populácia Bantu, ktorá pochádza zo severného Kamerunu sa signifikantne líši iba od subpopulácií Fulbov z oblasti Diafarabé, Banfora, Abalak, Ader a Linia. Ostatné fulbské subpopulácie v porovnaní s populáciou Bantu nevykazujú významne rozdiely. Štatisticky významné rozdiely neboli zistené ani pri porovnávaní subpopulácií z oblasti Diafarabé, Abalak, Ader a Balatungur s populáciou Wairak z Tanzánie. Východoafrické populácie Hutu a Tutsi sa signifikantne nelíšia od Fulbov z oblasti Bongor a Tindangou. Subpopulácia Fulbov z oblasti Balatungur sa významne nelíši od obyvateľstva Mali, strednej a južnej Afriky. Kompletne výsledky analýzy genetickej vzdialenosti všetkých 37 afrických populácií sú uvedené v Prílohe 2.

5.3 Génová diverzita

Analýza génovej diverzity bola spravená pomocou štatistického programu Arlequin 3.1.1. Génová diverzita je definovaná ako pravdepodobnosť, že dva náhodne vybrané haplotypy budú rozdielne.

Analýzou génovej diverzity chromozómu Y sme zistili, že populácia Fulbov je veľmi heterogennou populáciou. Hodnota génovej diverzity sa dosť variabilná a pohybuje sa v rozpätí od 0,28 – 0,78. Rovnako aj ostatné populácie Afriky vykazujú pomerne veľkú variabilitu génovej diverzity zistenej analýzou chromozómu Y.

Najnižšiu génovú diverzitu sme zaznamenali u subpopulácie Fulbov pochádzajúcich z oblasti Tindangou z Burkiny Faso, zatiaľ čo v druhej oblasti v Burkine Faso bola zistená génová diverzita až 0,74. Najvyššiu génovú diverzitu spomedzi sledovaných subpopulácií Fulbov sme zaznamenali v oblasti Diffa z Nigeru. U ostatných nigerských oblastiach sa génová diverzita pohybovala v rozpätí od 0,56 – 0,73. Z nigerských oblasti bola najnižšia génová diverzita zistená v oblasti Ader. V oblasti Balatungur bola zistená diverzita 0,73. U Fulbov z oblasti Abalak dosahuje génová diverzita hodnotu 0,71 a v oblasti Zinder 0,67. U Fulbov z Mali boli zistená génová diverzita chromozómu Y 0,77. Subpopulácie z Čadu

vykazujú takmer rovnaké hodnoty génovej diverzity 0,48 a 0,54. Hodnota génovej diverzity u populácie Fulbov z Kamerunu dosahuje 0,66. Výsledky analýzy génovej diverzity jednotlivých subpopulácií Fulbov sú uvedené v Tab. 13. Kompletné výsledky génovej diverzity všetkých 37 afrických populácií sú uvedené v Prílohe 3.

Tab. 13. Výsledky génovej diverzity u jednotlivých subpopulácií Fulbov.

Populácia	Génová diverzita	Primerný počet párových rozdielov	Priemer génovej diverzity na lokus
Diafarabé	0,7700 +/- 0,0604	1,326667 +/- 0,853548	0,057681 +/- 0,041356
Banfora	0,7477 +/- 0,0493	1,061538 +/- 0,725801	0,046154 +/- 0,035154
Tindangou	0,2821 +/- 0,1417	0,564103 +/- 0,489885	0,024526 +/- 0,023942
Abalak	0,7143 +/- 0,0800	1,895238 +/- 1,125585	0,082402 +/- 0,054628
Ader	0,5684 +/- 0,0863	2,084211 +/- 1,215337	0,090618 +/- 0,059016
Balatungur	0,7308 +/- 0,0963	2,358974 +/- 1,373563	0,102564 +/- 0,067130
Diffa	0,7821 +/- 0,0794	3,871795 +/- 2,078042	0,168339 +/- 0,101559
Zinder	0,6750 +/- 0,0853	3,766667 +/- 2,003399	0,163768 +/- 0,097566
Tcheboua	0,6667 +/- 0,0917	2,181818 +/- 1,255438	0,094862 +/- 0,060901
Bongor	0,4767 +/- 0,1154	1,566667 +/- 0,966213	0,068116 +/- 0,046814
Linia	0,5455 +/- 0,0722	1,090909 +/- 0,773224	0,047431 +/- 0,037927

6 DISKUSIA

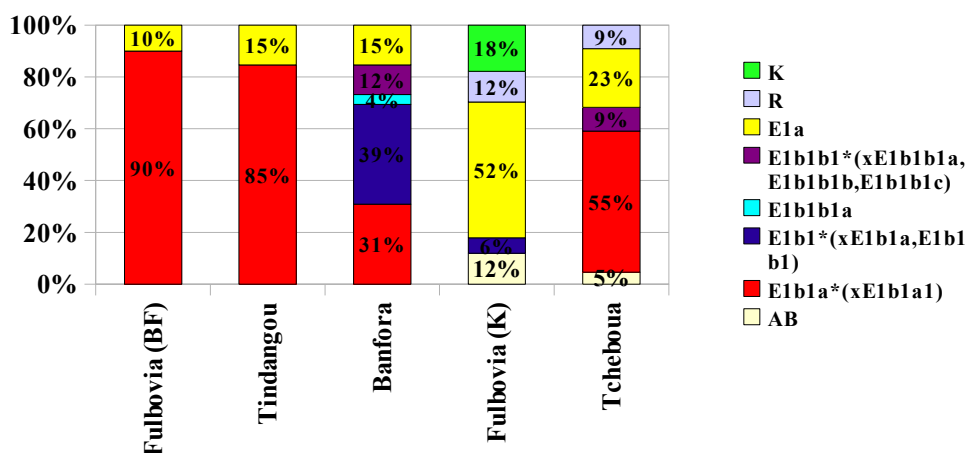
Technológia LabMAP Luminex je robustná metóda, ktorá už bola niekoľkokrát úspešne použitá na detekciu SNPs chromozómu Y. Vallone a Butler (2004) použili na typizáciu 42 SNP markerov chromozómu Y u 115 Afroameričanov a 114 Kaukazanov túto alelovú špecifickú hybridizáciu s použitím komerčného kitu Signet Y-SNP Identification System (Marligen Biosciences), ktorý sme používali aj v rámci tejto štúdie. V štúdií Bruchovej et al (2005) bola využitá táto technológia spolu s komerčne dodávaným kitom Signet Y-SNP Identification System pri analýze 30 mužských vzoriek pochádzajúcich z južných Čiech a Moravy. Kujanova et al (2009) použila túto metódu na detekciu SNPs chromozómu Y u 35 nepříbuzných jedincov z oázy el-Hayez v Egypte. Černý et al (2009) využil Signet Y-SNP Identification System pri analýze SNP polymorfizmov chromozómu Y mužských jedincov z ostrova Sokotra. Pereira et al (2010) využila technológiu LabMAP Luminex, ktorá je založená na princípe beads array, na detekciu SNP polymorfizmov chromozómu Y 90 vzoriek DNA Tuarégov z Mali, Burkiny Faso a Nigeru. Firma Marligen okrem genotypizačného kitu na SNPs chromozómu Y vyvinula aj podobný kit na analýzu HVS-I a HVS-II mtDNA.

Avšak technológia LabMAP Luminex má mnohostranné využitie. Okrem genotypizovania sa využíva aj na kvantifikáciu cytokínov v tkaninových kultúrach, testovanie markerov nádorových ochorení, autoimunitných a infekčných chorôb. Taktiež sa využíva pri typizácii HLA antigénov, na novorodenecký skrining a testovaní na alergie a Alzheimerovu chorobu (www.luminexcorp.com). Ďalšie využitie tejto technológie spočíva v analýze génovej expresie (Vašíková et al., 2009). V roku 2002 bola použitá na kvantifikáciu zápalových cytokínov a to tumor nekrotizujúceho faktoru- α a interleukínu-1 β (Prabhakar, Eirikis, Davis, 2002).

Rovnako ako aj Cruciani et al (2002) vo svojej štúdií detegoval typickú eurázijskú haploskupinu R1b, ktorá má pôvod v juhozápadnej Ázii, v afrických populáciách pochádzajúcich zo subsaharskej Afriky, čím potvrdil spätnú migráciu z Ázie späť do Afriky, tak aj v rámci tejto štúdie sme detegovali haploskupinu R v 16 vzorkách. Nositelia haploskupiny R pochádzajú z oblasti Abalak, Ader, Balatungur, Diffa, Zinder (Niger), Tcheboua (Kamerun) a Bongor (Čad). Najväčšie zastúpenie haploskupiny R1b bolo zaznamenané v Nigeri, kde sa vyskytuje vo frekvencii 15,7%. Cruciani et al (2002) u Fulbov z Kamerunu detegoval haploskupinu R u 12% jedincov. V rámci tejto štúdie bola zistená v Kamerune u 9,1% jedincov. Vysoký výskyt haploskupiny R v populácii Fulbov

bol zistení iba v štúdií Hassan et al (2008), ktorý túto eurázijskú haploskupinu detegoval u 54% Fulbov zo Sudánu. Haploskupina R sa vo vysokej frekvencii vyskytuje aj v ostatných populáciách subsaharskej Afriky. Najvyššie zastúpenie má táto haploskupina v severokamerunskej afroázijskej populácii Ouldeme, v ktorej sa vyskytuje až u 95% jedincov. V Čade sa vyskytuje s frekvenciou 67% a v Adamavských populáciách s frekvenciou 56%. Frekvencia výskytu u Nilo-Saharských populácií je 11% (Cruciani et al., 2002). Underhill et al (2000) detegoval haploskupinu R u 18% jedincov z Maroka. Haploskupina R sa vyskytuje v Afrike najmä v západnej, strednej a severnej oblasti Afriky. V južných ani vo východných oblastiach Afriky nebola haploskupina R zistená alebo sa vyskytuje len vo veľmi nízkej frekvencii.

Naše zistené výsledky zastúpenia jednotlivých haploskupín u Fulbov boli porovnané aj s ďalšími štúdiami, ktoré analyzovali populácie Fulbov z rôznych oblastí subsaharskej Afriky.



Graf 9. Percentuálne zastúpenia haploskupín v štúdií Cruciani et al (2002) a našej štúdií (BK-Burkina Faso, K-Kamerun).

Cruciani et al (2002) analyzoval 22 afrických populácií vrátane populácie Fulbov z Burkiny Faso a Kamerunu. Výsledky sú znázornené na Grafe 9. V populácií z Burkiny Faso bola pozorovaná redukcia diverzity chromozómu Y. Cruciani et al (2002) v populácií Fulbov z Burkiny Faso zistil výskyt iba dvoch polymorfizmov. Najviac zastúpeným bol polymorfizmus M2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1a*(x E1b1a1) a ktorý sa vyskytuje až u 90% jedincov. Zvyšných 10% pripadlo na polymorfizmus M33 definujúci haploskupinu E1a. Podobné výsledky sme zaznamenali aj mi v oblasti Tindangou v Burkin Faso, v ktorej rovnako dochádza k redukcii diverzity a detegovali sme taktiež iba polymorfizmus M2* a M33. Druhou analyzovanou oblasťou z Burkiny Faso bola

oblasť Banfora, v ktorej sme redukciu diverzity nezaznamenali. V oblasti Banfora sme na rozdiel od štúdie Cruciani et al (2002) a oblasti Tindangou zaznamenali najväčší výskyt východoafrického polymorfizmu P2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1*(x E1b1a, E1b1b1), zatiaľ čo u Fulbov najčastejšie sa vyskytujúci polymorfizmus M2* sa v oblasti Banfora vyskytuje len u 31% jedincov. Polymorfizmus M33 sa vo všetkých analyzovaných oblasti v Burkine Faso vyskytuje v približne rovnakej frekvencii. V oblasti Banfora sme okrem toho detegovali aj polymorfizmus M35*, ktorý definuje paraskupinu E1b1b1*(x E1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c) a v jedinom prípade aj polymorfizmus M78, ktoré definuje haploskupinu E1b1b1a. V oblasti Banfora sa vo vysokej miere vyskytujú polymorfizmy, ktoré majú svoj pôvod vo východnej Afrike.

Zo severného Kamerunu Cruciani et al (2002) analyzoval 17 vzoriek DNA Fulbov. Zastúpenie haploskupín u Fulbov z Kamerunu, ktoré detegoval Cruciani et al (2002) sa výrazne líši od haploskupín, ktoré boli u kamerunských Fulbov zistené v rámci tejto štúdie. Cruciani et al (2002) u viac než polovice Fulbov detegoval polymorfizmus M33, ktorý definuje haploskupinu E1a a ktorý sme v rámci tejto štúdie zistili len u 23% jedincov. V tejto štúdií najčastejšie sa vyskytujúcim polymorfizmom Fulbov je polymorfizmus M2*, ktorý tím vedený Crucianim u kamerunských Fulbov nezistil. Haploskupiny AB⁵ zdieľa 12% jedincov, zatiaľ čo mi sme tieto najstaršie africké haploskupiny zistili u 5% jedincov. Eurázijská haploskupinu R bola v obidvoch štúdiách detegovaná s v približne rovnakej frekvencii. Štúdia Crucianiho et al (2002) ešte naviac zistila u Fulboch výskyt polymorfizmu P2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1*(x E1b1a, E1b1b1) a haploskupinu K2 (v súčasnosti sa označuje ako novo vytvorená haploskupina T), ktorá je definovaná polymorfizmom M70. V našej štúdií tieto dve polymorfizmy v populácii Fulbov z Kamerunu neboli detegované. Na rozdiel od štúdie Cruciani et al (2002) sme u Fulboch zistili výskyt aj polymorfizmu M35*, ktorý definuje paraskupinu E1b1b1*(x E1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c).

Zistený rozdiel v zastúpení jednotlivých polymorfizmov medzi prácou Cruciani et al (2002) a touto štúdiou môže byť spôsobený malým počtom analyzovaných vzoriek, oblasťou odkiaľ pochádzajú vzorky a ich spôsobom života. Štúdia Crucianiho neuvádza, či vzorky DNA pochádzajú od kočovných alebo usadlých skupín Fulbov. U usadlých populácií môže dochádzať k oveľa väčšiemu miešaniu fulbskej populácie s ostatnými populáciami žijúcimi na rovnakom území a ktoré zdieľajú aj iné haploskupiny. Y chromozóm je taktiež v porovnaní s ostatnými chromozómami oveľa viac citlivejší 5 Použitý kit, ktorý nám určil hlavné vetvy stromu podľa YCC neumožňuje odlišenie haploskupiny A od haploskupiny B, ale zaraďuje obidve haploskupiny do jednej vetvy.

na pôsobenie genetického driftu (Jorde et al., 2000; Underhill et al., 2001). A tak pôsobením genetického driftu môže dôjsť v krátkom čase k náhlym zmenám frekvencií jednotlivých polymorfizmov. V rámci tejto štúdie bolo analyzovaných 22 vzoriek DNA a štúdia Crucianiho analyzovala 17 vzoriek Fulbov.

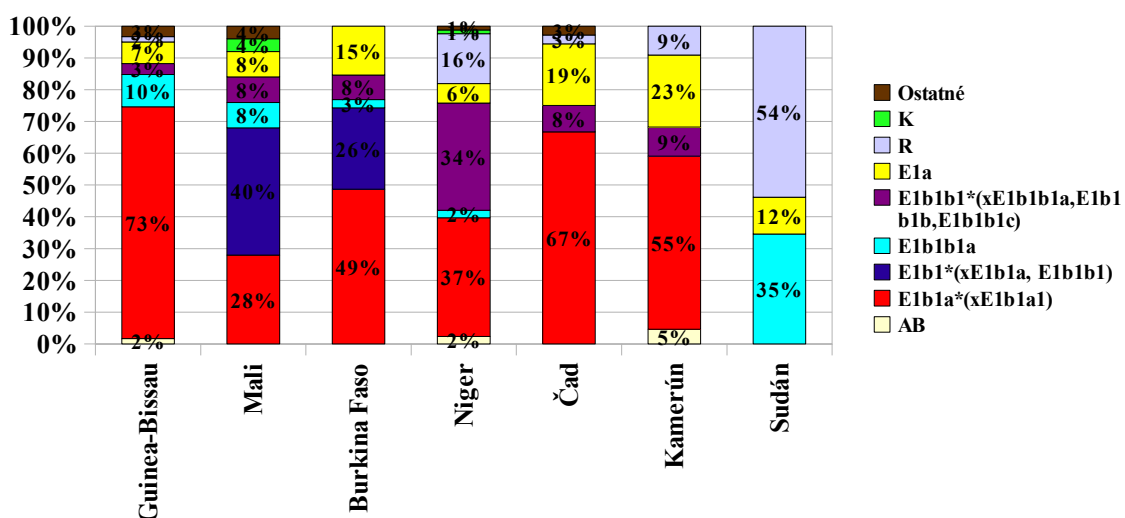
Ďalšou štúdiou, ktorá sa zaoberala analýzou fulbskej populácie, je štúdia Rosa et al (2007), ktorá analyzovala 59 fulbských vzoriek pochádzajúcich z Guinei-Bissau. Zastúpením haploskupín sa populácia Fulbov z Guinei-Bissau nelíši od nami analyzovaných subpopulácií Fulbov. Rovnako ako Rosa et al (2007) zistila najväčšie zastúpenie polymorfizmu M2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1a*(x E1b1a1) v populácií Fulbov pochádzajúcich z Guinei-Bissau, tak aj my sme v jednotlivých štátoch zistili najväčšie zastúpenie práve tohto polymorfizmu. Výnimku tvoria Fulbovia z Mali (oblasť Diafarabé), u ktorých sa z najvyššou frekvenciou vyskytuje paraskupina E1b1*(x E1b1a, E1b1b1).

Polymorfizmus P2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1*(x E1b1a, E1b1b1) má svoj pôvod vo východnej Afrike. Oproti populácie z Guinei-Bissau sa u nigerskej subpopulácie Fulbov vo vysokej frekvencii vyskytuje aj ďalšia pôvodne východoafrická paraskupina E1b1b1*(x E1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c), ktorá je definovaná polymorfizmom M35*. Postupne smerom z Guinei-Bissau na východ klesá výskyt haploskupiny E1b1b1a, ktorá je daná polymorfizmom M78, a v Čade a Kamerune už vôbec nebol polymorfizmus M78 detegovaný. Polymorfizmus M78 sa vyskytuje najmä v Európe, Strednom Východe a v severnej a východnej Afrike (Semino et al., 2004). Populácie Fulbov z Nigeru vykazuje oproti ostatným štátom vyššiu frekvenciu eurázijskej haploskupiny R. V Mali a v Burkin Faso sa v pomernej vysokej frekvencii vyskytuje paraskupina E1b1*(x E1b1a, E1b1b1), ktorú určuje polymorfizmus P2* a ktorá v ostatných štátoch u Fulbov nebola detegovaná. Výskyt najstarších haploskupín chromozómu Y bol zistený okrem Guinei-Bissau aj v Nigeri a Kamerune avšak iba v nízkej frekvencii.

Hassan et al (2008) analyzoval populácie Sudánu, vrátane populácie Fulbov. Zastúpenie jednotlivých haploskupín u Fulbov zo Sudánu sa výrazne líši od ostatných fulbských subpopulácií ako to môžeme vidieť na Grafe 10. Najväčšie zastúpenie má haploskupina R, ktorú zdieľa až 54% sudánskych Fulbov. Takisto aj zastúpenie haploskupiny E1b1b1a (35%), ktorá je definovaná polymorfizmom M78, je vo vysokej frekvencii oproti ostatným subpopuláciám Fulbov. Tento polymorfizmus sa vo vysokej frekvencii vyskytuje aj u ostatných severoafrických populáciách. Výskyt polymorfizmu M33 (haploskupina E1a) je porovnateľný s ostatnými subpopuláciami Fulbov. Ostatné

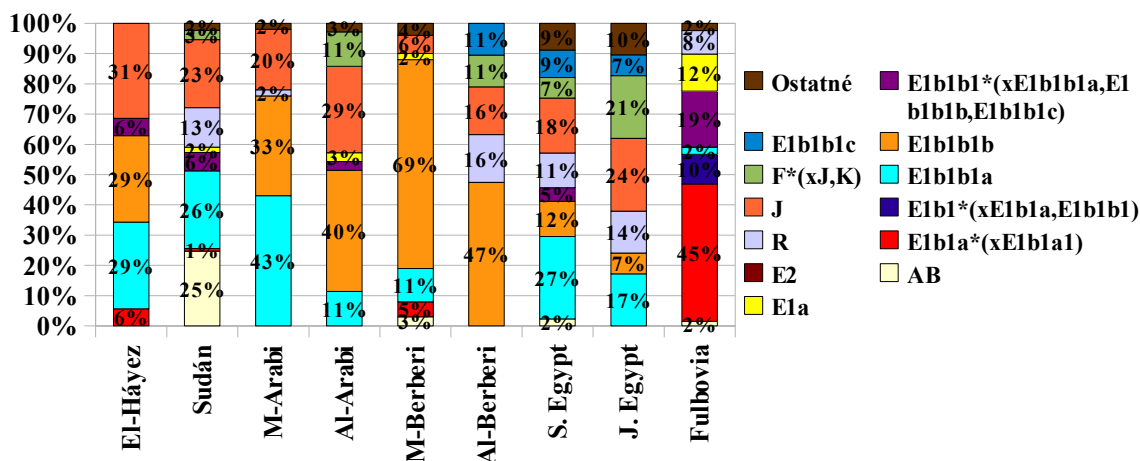
polymorfizmy u Fulbov pochádzajúcich zo Sudánu neboli zistené.

Hoci Fulbovia so Sudánu patria taktiež k nomádskej pastierskej skupine Fulbov, tak v porovnaní s ostatnými subpopuláciami Fulbov strednej a západnej Afriky vykazujú významne rozdieli v zastúpení jednotlivých haploskupín. Polymorfizmus M78, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1a má svoj pôvod vo východnej Afrike. Ale na druhej strane sa v sudánskej subpopulácii Fulbov vo vysokej miere vyskytuje haploskupina R, ktorá vznikla v juhozápadnej Ázii, čo nahráva teórii o pôvode Fulbov na Ázijskom kontinente.



Graf 10. Percentuálne zastúpenie haploskupín populácie Fulbov v jednotlivých štátoch subsaharskej Afriky.

Populácia Fulbov a severná Afrika



Graf 11. Percentuálne zastúpenie haploskupín populácií severnej Afriky a Fulbov z našej štúdie (M-Maroko, Al-Alžírsko).

Zistené výsledky populácie Fulbov sme porovnali aj s ostatnými populáciami a oblasťami severnej Afriky. Z Grafu 11 môžeme usúdiť, že populácia Fulbov sa

zastúpením jednotlivých polymorfizmov výrazne líši od obyvateľstva severnej Afriky. Rozdiel spočíva nielen v percentuálnom zastúpení ale aj vo výskyte jednotlivých polymorfizmov.

V severnej Afrike má najväčšie zastúpenie polymorfizmus M81, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1b, a ktorý sa v egyptskej oáze El-Háyez vyskytuje u 29% (Kujanova et al., 2009), v severnom a južnom Egypt sa vyskytuje v relatívne malej frekvencii (Arredi et al., 2004), u Marockých Araboch u 33% a u Marockých Berberov u 69% (Cruciani et al., 2002), u Berberov z Alžírsku bola zistená u takmer polovice populácie a alžírskych Araboch sa vyskytuje u 40% populácie (Arredi et al., 2004). V populácii Fulbov tento polymorfizmus nebol detegovaný. Polymorfizmus M81 sa vo vysokých frekvenciách vyskytuje práve v severnej a severozápadnej Afrike. Smerom na východ klesá a v subsaharskej Afrike sa už vôbec nevyskytuje (Bosch et al., 2001; Cruciani et al., 2002, Cruciani et al., 2004). Distribúcia tohto severoafrického polymorfizmu je spojená z rozširovaním sa berbersky hovoriacich populácií.

Ďalším polymorfizmom, ktorý bol detegovaný v severnej Afrike s vysokou frekvenciou, ale nevyskytuje sa u Fulbov je polymorfizmus M304, ktorý nám určuje haploskupinu J a ktorý zdieľa 31% Egyptanov z El-Háyez (Kujanova et al., 2009), 18% Egyptanov zo severu a 24% Egyptanov z juhu, 16% Berberov a 29% Arabov z Alžírsku (Arredi et al., 2004), 20% Arabov a 6% Berberov z Maroka (Cruciani et al., 2002). Hassan et al (2008) ho zistil u 23% jedincov Sudánu.

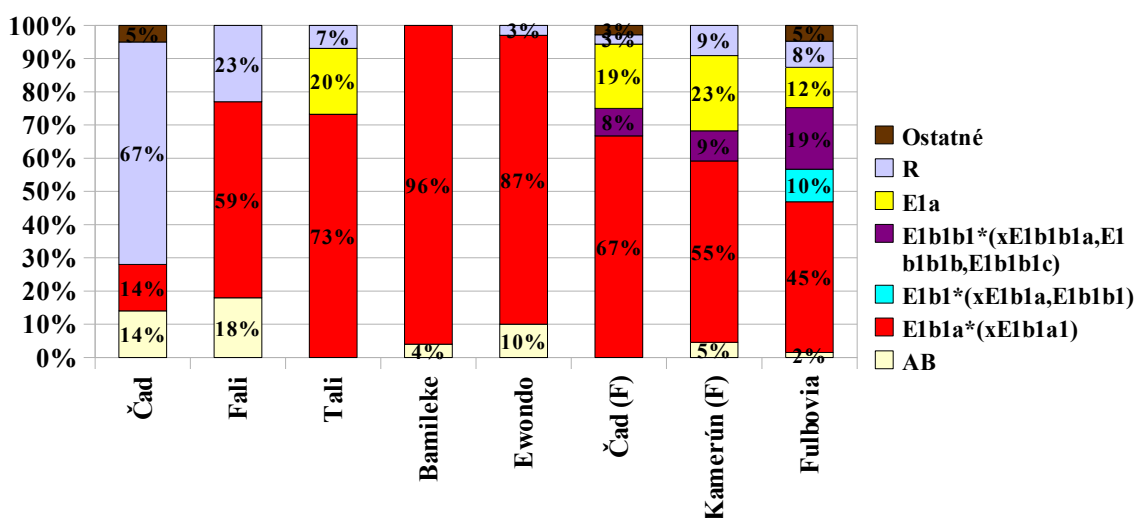
V severnej Afrike medzi majoritne sa vyskytujúce polymorfizmy patrí aj polymorfizmus M78, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1a a ktorý v populácii Fulbov bol zistený iba u 2% jedincov. V oáze El-Háyez sa vyskytuje u 29% jedincov (Kujanova et al., 2009), v severnom Egypte u 27% jedincov, v južnom Egypte u 17% jedincov (Arredi et al., 2004) a v Sudáne u 26% jedincov (Hassan et al., 2008).

U egyptských a berberských populáciách bol ešte navyše zistený výskyt polymorfizmu M123, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1c a ktorý sme v populácii Fulbov taktiež nedetegovali. Najväčšie, až 43% zastúpenie, má u Arabov z Maroka (Cruciani et al., 2002). Nebol zistený iba u Berberov z Alžírsku (Arredi et al., 2004).

Najčastejšie sa vyskytujúcim polymorfizmom Fulbov je polymorfizmus M2*, ktorý zdieľa 45% jedincov. V severnej Afrike bol zistený iba v minoritnom výskyte u Egyptanov z oázy El-Háyez (Kujanova et al., 2009), Berberov (Cruciani et al., 2002) a Sudáncov (Hassan et al., 2008). Populácia Fulbov sa od severnej Afriky líši aj výskytom polymorfizmu M33, ktorý definuje haploskupinu E1a.

V úvodnej kapitole jedná z teórií hovorila o protoberberskom a egyptskom pôvode Fulbov. Na Graf 11 môžeme vidieť, že berberské obyvateľstvo Maroka a Alžírska a egyptské obyvateľstvo sa zastúpením haploskupín významne líši od zastúpenia haploskupín, ktoré boli zistené v populácii Fulbov. A aj Fst analýza preukázal významnú odlišnosť Berberov z Alžírska od všetkých analyzovaných subpopulácií Fulbov. Fst analýza rovnako preukázala štatisticky významnú odlišnosť populácie Fulbov od populácií severného a južného Egypta a egyptskej oázy El-Háyez. A preto táto teória o pôvode Fulbov, ktorá odvodzuje ich pôvod od egyptského alebo berberského obyvateľstva sa na základe molekulárno-genetickej analýzy markerov chromozómu Y javí len ako veľmi málo pravdepodobná.

Populácia Fulbov a stredná Afrika



Graf 12. Percentuálne zastúpenie haploskupín v strednej Afrike a Fulbov tejto štúdie (F- Fulbovia).

Už na prvý pohľad sa populácia Fulbov líši od ostatných populácií žijúcich v strednej a západnej Afrike. V porovnaní s okolitými černošskými kmeňmi majú Fulbovia bledšiu pokožku, europoidné črty tváre, úzke pery a rovnejšie vlasy (Černý et al., 2006). Tieto markantné fyzické rozdiely sa prejavujú aj v zastúpení jednotlivých haploskupín zistených u Fulboch v porovnaní s ostatnými populáciami strednej a západnej Afriky.

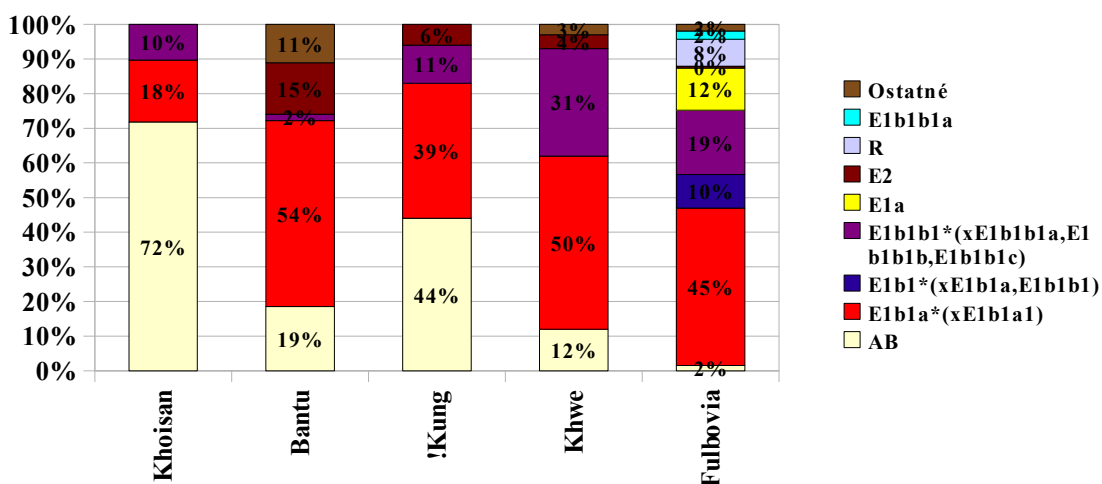
Ak porovnáme populáciu Fulbov z Čadu s ostatnými populáciami žijúcimi v Čade, ktoré analyzoval Cruciani et al (2002) zistíme výrazne rozdiely v zastúpení jednotlivých SNP polymorfizmov chromozómu Y. Cruciani et al (2002) u Čadských populácií v 14% detegoval najstaršie haploskupiny AB, zatiaľ čo v našej štúdií haploskupiny AB u Fulboch neboli detegované. Polymorfizmus M2* bol u Fulboch zistený u 67% jedincov, zatiaľ čo

v nefulbských populáciách Čadu sa vyskytuje iba u 14% jedincov. Cruciani et al (2002) ďalej detegoval u 7% jedincov polymorfizmus M78, zatiaľ čo mi sme tento polymorfizmus u Fulbov z Čadu nezistili. Najviac až 67% jedincov z Čadu je nositeľmi eurázijskej haploskupiny R, ktorá je definovaná polymorfizmom M207. U Fulbskej populácie z Čadu sme tento polymorfizmus detegovali iba v jednom prípade. Ostatné polymorfizmy, ktoré sme zistili v populácií Fulbav sa v ostatných porovnávaných populáciách Čadu nevyskytujú.

Cruciani et al (2002) analyzoval aj populácie severného a južného Kamerunu. Medzi populácie severného Kamerunu patria populácie Fali a Tali. Ak tieto populácie porovnáme s našou populáciou Fulbov, ktorá pochádza z oblasti Tcheboua v Kamerune zistíme, že vo všetkých týchto populáciách je najviac zastúpený polymorfizmus M2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1a*(xE1b1a1). Haploskupinu R sme zistili u 9% jedincov, zatiaľ čo Cruciani et al (2002) ju detegoval v populácií Fali u 23% jedincov a v populácií Tali u 7% jedincov. V populácií Tali bola ešte zistená u 18% jedincov haploskupiny AB, ktorú sme u Fulboch z Kamerunu zistili len u 5% jedincov. Rovnako ako Cruciani et al (2002) zistil v populácií Tali polymorfizmus M33 u 20% jedincov, tak aj my sme tento polymorfizmus detegovali u 23% Fulbov. Nefulbské populácie južného Kamerunu vykazujú redukciu diverzity chromozómu Y. S najvyššou frekvenciou sa tam takisto vyskytuje polymorfizmus M2*, ktorý Cruciani et al (2002) zistil u 96% jedincov populácie Bamileke a 87% populácie Ewondo. Zvyšné 4% jedincov populácie Bamileke zdieľa haploskupiny AB. V populácií Ewondo boli ešte u 10% jedincov zistené haploskupiny AB u 3% haploskupina R.

Populácia Fulbov sa od ostatných stredoafrických populácií líši výskytom polymorfizmu P2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1*(xE1b1a,E1b1b1) a ktorú Cruciani et al (2002) v žiadnej populácií strednej Afriky nedetegoval. Rovnako aj polymorfizmus M35*, ktorý definuje paraskupinu E1b1b1*(xE1b1b1a,E1b1b1b,E1b1b1c) sa u Fulboch vyskytuje u 19% jedincov, zatiaľ čo v ostatných populáciách strednej Afriky nebol zistený. Polymorfizmus M33 definujúci haploskupinu E1a sme zistili u 12% Fulbov. V porovnávaných populáciách bol zistený len u 20% jedincov populácie Tali (Cruciani et al., 2002). Aj keď Fulbovia v Čade a Kamerune geograficky patria do oblasti strednej Afriky tak výskytom a zastúpením jednotlivých haploskupín sa od ostatných stredoafrických populácií významne líšia. So strednou Afrikou ich spája iba vysoký výskyt polymorfizmu M2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1a*(xE1b1a1).

Populácia Fulbov a južná Afrika



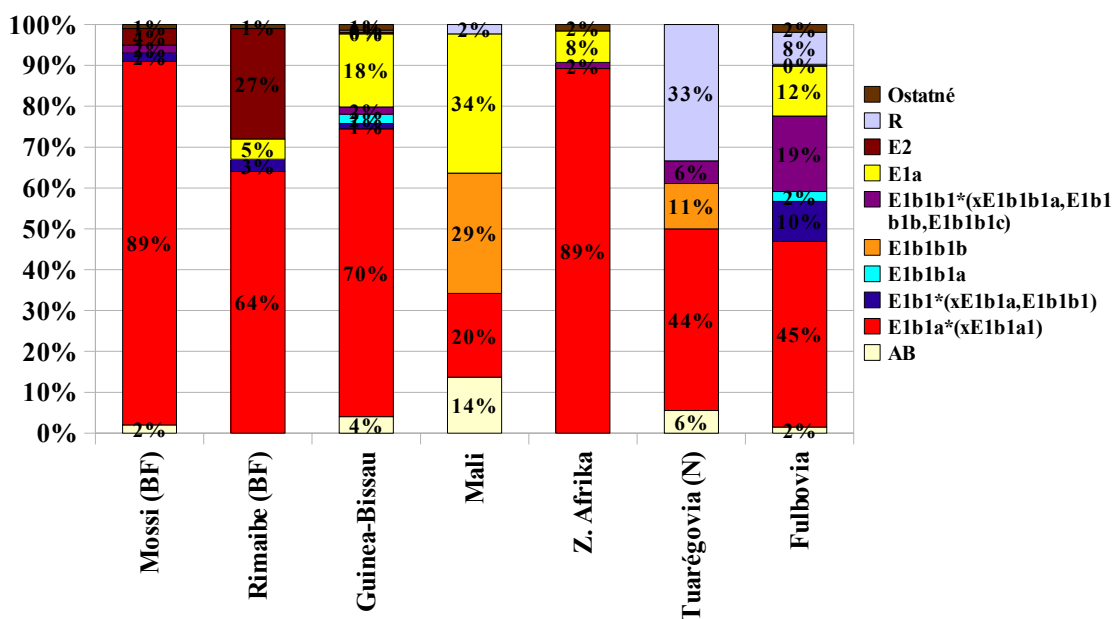
Graf 13. Percentuálne zastúpenie jednotlivých haploskupín v južnej Afrike v porovnaní s populáciou Fulbov.

Rovnako ako u Fulbov bol najčastejšie detegovaným polymorfizmom polymorfizmus M2*, tak aj v populáciách južnej Afriky sa tento polymorfizmus vyskytuje vo vysokých frekvenciách.

Na Grafe 13 môžeme vidieť, že iba u Khoisanoch bola zistená prevaha najstarších haploskupín chromozómu Y (Underhill et al., 2000). Najstaršie haploskupiny AB chromozómu Y boli v južnej Afrike v porovnaní s populáciou Fulbov zistené pomerne s vysokou frekvenciou. Cruciani et al (2002) detegoval tieto haploskupiny u 44% jedincov populácie !Kung a u 12% jedincov populácie Khwe. Avšak v populácii Fulbov boli haploskupiny AB zistené iba u 2% jedincov.

V južnej Afrike sa v porovnaní s Fulbmi častejšie vyskytuje polymorfizmus M75, ktorý definuje haploskupinu E2 a ktorý sme u Fulboch zistili iba v jednom prípade. V Populácii Bantu Underhill et al (2000) zistil výskyt tohto polymorfizmu až u 15% jedincov. Populácia Fulbov zase naopak zdieľa niektoré polymorfizmy, ktoré v južnej Afrike neboli zistené. V južnej Afrike nebol zistený výskyt polymorfizmu M33, ktorý definuje haploskupinu E1a, rovnako aj polymorfizmu M78, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1a. V južnej Afrike sa taktiež nevyskytuje polymorfizmus P2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1*(x E1b1a, E1b1b1) (Cruciani et al., 2002; Underhill et al., 2000).

Populácia Fulbov a západná Afrika



Graf 14. Haploskupiny západnej Afriky a subsaharskej populácie Fulbov tejto štúdie
(BF- Burkina Faso).

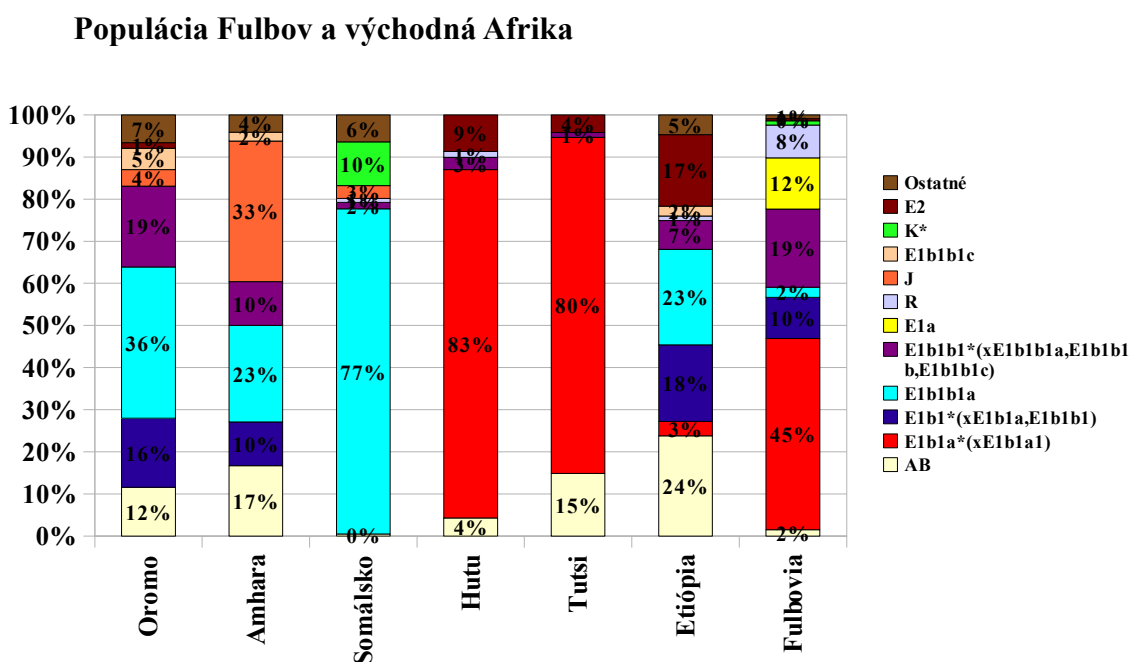
Vzorky Fulbov, ktoré pochádzajú z Mali, Burkiny Faso a Nigeru patria do západnej Afriky. Väčšina populácií západnej Afriky rovnako ako populácia Fulbov sa taktiež vyznačuje najvyšším zastúpením polymorfizmu M2* definujúcim haploskupinu E1b1a*(xE1b1a1). Výnimku predstavuje Mali, kde bol zistený iba u 20% jedincov (Underhill et al., 2000). Rovnako aj v subpopulácií Fulbov z Mali sa tento polymorfizmus vyskytuje len u 28% jedincov.

Zo západnou Afrikou populácia Fulbov zdieľa aj podobný výskyt polymorfizmu M33 (haploskupina E1a). Výnimku tvoria populácie Mossi z Burkiny Faso (Cruciani et al., 2002) a Tuarégovia z Nigeru (Pereira et al., 2010), u ktorých tento polymorfizmus nebol detegovaný a obyvateľstvo Mali, u ktorého sa vyskytuje v pomerne vysokej frekvencii.

Fulbovia sa od ostatných populácií západnej Afriky líšia pomerne vysokým výskytom polymorfizmu M35*, ktorý definuje paraskupinu E1b1b1*(xE1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c) a ktorý sa v ostatných populáciách západnej Afriky vyskytuje len v nízkej frekvencii.

Obyvateľstvo Mali a populácia Tuarégov z Nigeru sa taktiež vyznačuje výskytom polymorfizmu M81, ktorý v ostatných porovnávaných populáciách ani v populácií Fulbov nebol zistený. Populácia Rimaibe sa zase vyznačuje vysokou frekvenciou polymorfizmu M75, ktorý bol u Fulboch zistený iba v jednom prípade. V závere môžeme zhodnotiť, že populácia Fulbov výskytom a percentuálnym zastúpením haploskupín vykazuje určite

podobnosti s ostatnými populáciami západnej Afriky. A aj na základe Fst analýz a MDS grafu sme zistili, že subpopulácie z oblasti Ader a Abalak v Nigeru sú si veľmi blízke s obyvateľstvom Mali. Na MDS grafu môžeme taktiež vidieť, že Tuarégovia z Nigeru majú blízky vzťah k subpopuláciám Fulbov pochádzajúcich z oblasti Diffa a Zinder v Nigeri. V závere môžeme povedať, že populácie západnej Afriky určite prispeli do genofondu populácie Fulbov.



Graf 15. Zastúpenie haploskupín vo východnej Afrike a fulbskej populácie tejto štúdie.

Na Grafe 15 môžeme vidieť percentuálne zastúpenie a výskyt jednotlivých haploskupín chromozómu Y Fulbov a niekoľkých populácií východnej Afriky. Najčastejšie sa vyskytujúci polymorfizmus Fulbov u porovnávaných populácií nebol v niektorých populáciách vôbec zistený alebo sa vyskytuje len v nízkej frekvencii. Výnimku tvoria populácie Hutu a Tutsi, kde sa tento polymorfizmus vyskytuje vo veľmi vysokej frekvencii (Luis et al., 2004). V nízkej frekvencii ho môžeme pozorovať aj v Etiópií (Semino et al., 2002). Na základe Fst analýz a MDS grafu sme taktiež zistili, že populácie Hutu a Tutsi sa podobajú subpopuláciám Fulbov z oblasti Tindangou z Burkiny Faso. Populácie Hutu a Tutsi taktiež nevykazujú signifikantné rozdiely so subpopuláciami z oblasti Bongor a Tindangou.

Populácia Fulbov sa od východnej Afriky líši aj výskytom polymorfizmu M33, ktorý v porovnávaných východoafrických populáciách nebol zistený. Tento polymorfizmus M33, ktorý definuje haploskupinu E1a sa vyskytuje výlučne v subsaharskej Afrike. Vo východnej Afrike sa naopak veľmi často vyskytuje polymorfizmus M78 (haploskupina

E1b1b1a), ktorý Sanchez et al (2004) zistil až u 77% Somálcov a Semino et al (2002) u 36% jedincov populácie Oromo a 23% jedincov a 23% Etiópčanov. My sme tento polymorfizmus detegovali iba u 2% jedincov populácie Fulbov.

Vo východnej Afrike sa na rozdiel od Fulbov vyskytuje ešte aj polymorfizmus M304 (haploskupina J) a polymorfizmus M123 (haploskupina E1b1b1c). Eurázijskú haploskupinu R sme detegovali u 8% Fulbov, zatiaľ čo v porovnávaných populáciách ju zistil iba Sanchez et al (2004) u 2% Somálcov.

Na základe antropologických výskumoch lebečných štruktúr jedna z teórií v úvode naznačila ich príbuznosť z etiópskym obyvateľstvom. Na základe SNP polymorfizmov chromozómu Y Fulbovia vykazujú podobnosti nielen s etiópskym obyvateľstvom ale aj s ostatnými populáciami východnej Afriky. Na základe Fst analýzy a z MDS grafu môžeme vidieť, že populácie Fulbov sú si bližšie s etiópskym obyvateľstvom než egyptským obyvateľstvom. Jednotlivé subpopulácie Fulbov zdieľajú blízke príbuzenské vzťahy aj s inými východoafrickými populáciami ako sú populácia Hutu, Tutsi z Rwandy a Wairaki z Tanzánie.

Ich východoafrickému pôvodu nasvedčuje aj pomerne vysoký výskyt (18,54%) polymorfizmu M35*, ktorý určuje paraskupinu E1b1b1*(xE1b1b1a, E1b1b1b, E1b1b1c) a ktorý sa vo vysokej frekvencii vyskytuje vo východnej a južnej Afrike. V populácii Fulbov sa v nízkej frekvencii (2,44%) taktiež vyskytuje aj polymorfizmus M78 a polymorfizmus P2* s frekvenciou výskytu 9,76%. Polymorfizmus M78, ktorý definuje haploskupinu E1b1b1a má svoj pôvod práve vo východnej Afrike. Paraskupina E1b1*(xE1b1a1), ktorá je definovaná polymorfizmom P2*, ktorú sme detegovali v populácii Fulbov z Mali a Burkiny Faso sa taktiež s vysokou frekvenciou vyskytuje hlavne v Etiópií (Cruciani et al., 2004). Ale na druhej strane najčastejšia fulbská haploskupina E1b1a*(xE1b1a1), ktorá je definovaná polymorfizmom M2* je považovaná za pozostatok Bantuskej expanzie. Prvé bantusky hovoriace skupiny ľudí žili v oblasti dnešnej Nigérie a Kamerunu pred 4000 rokmi a postupne sa rozširovali do východnej a južnej Afriky.

V závere môžeme povedať, že na vytváraní genofondu analyzovaných nomádskych subpopulácií Fulbov sa podieľali jednak východoafrické a jednak aj západoafrické populácie.

Populácia Fulbov sa nám na základe analýzy chromozómu Y javí ako značne heterogenná skupina. Génová diverzita chromozómu Y v porovnaní s génovou diverzitou mtDNA tých istých subpopulácií Fulbov, ktorá bola prevedená Černým et al (2006) sa

pohybuje vo veľkom rozpätí. Analýza mtDNA štyroch subpopulácií Fulbov, ktoré boli analyzované aj v rámci tejto štúdie, definuje populáciu Fulbov ako pomerne homogénnu populáciu. Génová diverzita určená prostredníctvom mtDNA markerov sa v subpopulácií Fulbov pohybuje v rozpätí 0,893-0,953. Zatiaľ čo génová diverzita chromozómu Y tých istých subpopulácií, analyzovaných v tejto štúdií sa pohybuje v rozpätí od 0,282 do 0,748. Podobnú variabilitu génovej diverzity chromozómu Y sme pozorovali aj u ostatných nefulbských populácií Afriky.

Génová diverzita je ovplyvnená viacerými činiteľmi. Rozdieli medzi génovými diverzitami zistením prostredníctvom mtDNA a chromozómu Y v jednej populácii sú výsledkom niekoľkých faktorov. Medzi najdôležitejšie faktory, ktoré významne ovplyvňujú diverzitu je patrilokalita. Zatiaľ čo muži zostávajú v mieste svojho narodenia, ženy sa sťahujú so svojím manželom a vnášajú do populácie svoje haploskupiny a tým zvyšujú aj diverzitu mtDNA. Redukcia diverzity chromozómu Y je patrná aj v spoločenstvách, ktoré praktizujú polygyniu (Kayser et al., 2003).

Analýza mtDNA 186 vzoriek populácie Fulbov, ktoré pochádzali z oblasti Tindangou, Tcheboua, Banfora a Bongor a ktorá bola prevedená Černým et al (2006) zistila že signifikantná väčšina analyzovanej populácie Fulbov zdieľa subsaharskú haploskupinu L. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce haploskupiny mtDNA v populácii Fulbov patrí haploskupina L3b, ktorá je determinovaná prostredníctvom motívu 16124, 16223, 16278 a 16362 a haploskupina L3d, ktorú definuje motív 16124 a 16223. Tieto haploskupiny majú svoj pôvod v západnej Afrike.

Druhov veľmi často vyskytujúcou sa haploskupinou bola haploskupina L1b, ktorá je definovaná HVS-I motívom 16126, 16187, 16189, 16223, 16264, 16270, 16278, a 16311 a taktiež sa jej pôvod odvodzuje v západnej Afrike. Medzi ostatné haploskupiny, ktoré sa vyskytovali iba v nízkych frekvenciách patria ešte haploskupiny L2b a L2c, ktoré rovnako ako predošlé spomínané haploskupiny, taktiež vznikli v západnej Afrike. V nízkej frekvencii populácia Fulbov zdieľa haploskupiny, ktoré majú svoj pôvod v severnej Afrike a Eurázií. Analýza mtDNA populácie Fulbov nedetegovala žiadne haploskupiny, ktoré by mali pôvod vo východnej Afrike.

Už v roku 1998 Seielstad, Minch a Cavalli-Sforza zistili, že varianty chromozómu Y majú vyššiu tendenciu byť lokalizované vzťahom k určitej geografickej oblasti než varianty mtDNA alebo autozómov. Táto štúdia chromozómu Y okrem haploskupín, ktoré vznikli v západnej Afrike v populácii Fulbov odhalila aj pomerne vysoký výskyt východoafrických haploskupín. Z toho môžeme usúdiť, že analýzou chromozómu Y

môžeme oveľa lepšie zachytiť výskyt pôvodných haploskupín, ktoré sa podieľali na vytváraní genofondu populácie Fulbov než analýzou mtDNA. Fulbský muži si častejšie berú za manželky ženy, ktoré pochádzajú z okolitých západoafrických a stredoafrických populácií a tým sa do populácie Fulbov vnášajú mtDNA haploskupiny západoafrických a stredoafrických populácií.

Výsledkom odlišnosti vo výbere partnera, praktizovaní polygamie/monogamie a rozdielnej migračnej miere mužov a žien je vytvorenie určitého geografického vzorca a stupňa genetickej diverzity chromozómu Y, mtDNA a autozómov (Seielstad, Minch a Cavalli-Sforza, 1998).

7 ZÁVER

Technológia LabMAP Luminex nám umožnila jednoduchú a rýchlu detekciu Y chromozomálnych SNPs.

Takmer 90% jedincov analyzovaných subpopulácií Fulbov zdieľa africkú haploskupinu E. Okrem toho sme u 7,8% jedincov detegovali haploskupinu R, ktorá patrí medzi typické eurázijské haploskupiny a ktorá v populácií Fulbov boli zistená najmä v oblasti Diffa a Zinder v Nigeri, kde sa jej frekvencia výskytu pohybuje okolo 31%. Najstaršie haploskupiny chromozómu Y zdieľa iba 1,5% jedincov. V populácií Fulbov sme zaznamenali aj minoritný výskyt paraskupín K* a P*.

Výskytom a zastúpením jednotlivých haploskupín sa populácia Fulbov podobá populáciám západnej a rovnako aj východnej Afriky. So západnou Afrikou ju spája výskyt polymorfizmu M2*, ktorý definuje paraskupinu E1b1a*(xE1b1a1) a ktorý zdieľa 45,37% jedincov. Tento polymorfizmus vznikol v oblasti Kamerunu a šírila sa Bantuskou expanziou. Aj Fst analýza potvrdila ich príbuznosť s obyvateľstvom Mali a populáciou Tuarégov z Nigeru. S východnou Afrikou ich spája pomerne vysoký výskyt polymorfizmu M35* (haploskupina E1b1b1*(xE1b1b1a,E1b1b1b,E1b1b1c)), M78 (haploskupina E1b1b1a) a polymorfizmu P2* (E1b1*(xE1b1a1)) ktoré vznikli vo východnej Afrike a v susedných populácií Fulbov západnej a strednej Afrike sa nevyskytujú. Východoafrické haploskupiny zdieľa až 30,74% našich analyzovaných subpopulácií Fulbov. A aj Fst analýza preukázala podobnosť fulbských subpopulácií s východoafrickými populáciami Hutu, Tutsi a Wairaki. Populácia Fulbov pravdepodobne vznikla zmiešaním východoafrických populácií s populáciou subsaharskej Afriky. Antropologické výskumy lebečnej štruktúry sa taktiež prikláňajú k ich východoafrickému pôvodu.

Populácia Fulbov na základe analýzy chromozómu Y sa javí ako značne heterogenná populácia. Génová diverzita chromozómu Y je v porovnaní s génovou diverzitou mtDNA značne variabilná. Najnižšiu génovú diverzitu má subpopulácia z oblasti Tindangou (0,28) v Burkine Faso a najvyššiu génovú diverzitu má subpopulácia z oblasti Diffa (0,78) v Nigeri.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A- adenín

B.P.- before present

bp- báзовých párov

C- cytozín

DNA- kyselina deoxiribonukleová

dsDNA- dvojvláknová DNA (double strand DNA)

EtBr- etídium bromid

G- guanín

DHPLC- denaturačná vysoko výkonná kvapalinová chromatografia (denaturing high-performance liquid chromatography)

HERV- ľudské endogenné retrovírusy

HVS-I, HVS-II- hypervariabilná oblasť I a II mtDNA

kya- Kilo Years Ago

LINEs- dlhé rozptýlené jadrové elementy

LTR- long terminal repeats

Mb- mega báz

MDS- multidimensional scaling

MFI- stredná intenzita fluorescencie (Mean fluorescence intensity)

MSY- mužská špecifická oblasť

mtDNA- mitochondriálna kyselina deoxiribonukleová

NK- nukleové kyseliny

NRY- nerekombinantná oblasť chromozómu Y

p- hladina významnosti

PAR- pseudoautozomálna oblasť (pseudoautosomal region)

PCR- polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)

RFLP- polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (restriction fragment length polymorphism)

RNA- kyselina ribonukleová

SINEs-krátke rozptýlené jadrové elementy

SNPs- jednonukleotidové polymorfizmy

ssDNA- jednovláknová DNA (single strand DNA)

STRs-krátke tandemové opakovania (Short Tandem Repeats)

T- tymín

TMRCA- vek najbližšieho spoločného predka (Time to Most Recent Common Ancestor)

UEPs- Unique Event Polymorphisms

VNTR- variabilný počet tandemových opakovaní (variable number of tandem repeats)

YCC- Y chromosome consortium

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Anagnostopoulos T, Green PM, Rowley G, Lewis CM, Giannelli F. 1999. DNA variation in a 5-Mb region of the X chromosome and estimates of Sex-specific/type-specific mutation rate. *Am J Hum Genet* 64: 508-517.

Arredi B, Poloni SE, Paracchini S, Zerjal T, Fathallah DM, Makrelouf M, Pascali VL, Novelletto A, Tyler-Smith CH. 2004. A Predominantly Neolithic Origin for Y-Chromosomal DNA Variation in North Africa. *Am. J Hum Genet* 75:338-345.

Bannert N, Kurth R. 2004. Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. *PNAS*. Vol. 101. October 5. 2004.

Barich BE. 2002. Cultural responses to climatic changes in north Africa: Beginning and spread of pastoralism in the Sahara. In *Droughts, Food and Culture*. Springer US. 209-223 s. ISBN 978-0-306-47547-4.

Batzer MA, Stoneking M, Alegria-Hartman M, Bazan H, Kass DH, Shaikh TH, Novick GE, Ioannou PA, Scheer WD, Herrera RJ, Deininger PL. 1994. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 91, pp.12288-12292.

Bosch E, Calafell F, Comas D, Oefner PJ, Underhill PA, Bertranpetit J. 2001. High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited genes flow between north-western African and the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 68:1019-1029.

Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-457.

Brion M, Blanco-Verea A, Lareu V, Carracedo A. 2004. 29 Y-chromosome SNP analysis in European populations. *Internatiol Congress Series* 1261: 73-75.

Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234:177–186.

Bruchová H, Kráčmarová A, Černý V, Brdička R. 2005. Využití technologie LabMAP Luminex pro detekci SNP polymorfismů. *Klin Biochem Metab* 13:87-91.

Butler JM. 2005. Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers. 2. vyd. Elsevier. USA. 660 s. ISBN 9780121479527.

Capelli C, Redhead N, Romano V, Cali F, Lefranc G, Delague V, Megarbane A, Felice AE, Pascali VL, Neophytou PI, Poulli Z, Novelletto A, Malaspina P, Terrenato L, Berebbi A, Fellous M, Thomas MG, Goldstein DB. 2005. Population Structure in the Mediterranean Basin: A Y Chromosome Perspective. *Ann Hum Genet* 70:207–225.

Capelli C, Wilson JF, Richards M, Stumpf MP, Gratrix F, Oppenheimer S, Underhill P, Pascali VL, Ko TM, Goldstein DB. 2001. A predominantly indigenous paternal heritage for Austronesian-speaking peoples of insular Southeast Asian and Oceania. *Am J Hum Genet*. 68:432-443.

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Skalkr P, Ardile K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. 1999. Characterization of single nucleotide polymorphism in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231–238.

Casanova M, Leroy P, Boucekkine C et al. 1985. A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science* 230:1403-1406.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. 1994. The history and geography of human genes. Princeton University Press, New Jersey. 518 s. ISBN 0-691-08750-4.

Cinnioglu C, King R, Kivisild T, Kalfoglu E, Atasoy S, Cavalleri GL, Lillie AS, Roseman CC, Lin AA, Prince K, Oefner PJ, Shen P, Semino O, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA. 2004. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Hum Genet* 114:127–148.

Claussen M, Gayler V. 1997. The Greening of the Sahara during the Mid-Holocene: Results of an Interactive Atmosphere-Biome Model. *Global Ecology and Biogeography Letters* 6:369-377.

Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF. 1998. Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase. *Am J Hum Genet* 63:595-612.

Cremaschi M, di Lernia S. 1999. Holocene climatic changes and cultural dynamics in the Libyan Sahara. *Afr Archaeol Rev.* 16:211-38.

Cremaschi M, di Lernia S. 2001. Environment and settlements in the Mid-Holocene palaeo-oasis of Wadi Tanezzuft (Libyan Sahara). *Antiquity* 75:815-825.

Cremaschi M, di Lernia, Garcea EAA. 1998. Some Insights on the Aterian in the Libyan Sahara: Chronology, Environment, and Archaeology. *Afr Archaeol Rev.*15:261-286.

Crawford M. 1973. The use of genetic markers of the blood in the study of the evolution of human populations. *Methods and Theories of Anthropological Genetics*. University of New Mexico Press, s 19-38.

Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, Modiano D, Holmes S, Destro-Bisol G, Coia V, Wallace DC, Oefner PJ, Torroni A, Cavalli-Sforza LL, Scozzari R, Underhill PA. 2002. A Back Migration from Asia to Sub-Saharan Africa Is Supported by High-Resolution Analysis of Human Y-Chromosome Haplotypes. *Am J Hum Genet* 70:1197-1214.

Cruciani F, FrattaR, Santolamazza P, Sellitto D, Pascone R, Moral P, Watson E, Guida V, Colomb EB, Zaharova B, Lavinha J, Vona G, Aman R, Cali F, Akar N, Richards M, Torroni A, Novelletto A, Scozzari R. 2004. Phylogeographic Analysis of Haplogroup E3b (E-M215) Y Chromosomes Reveals Multiple Migratory Events Within and Out Of Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 74:1014–1022.

Černý V. 2006. Lidé od Čadského jezera. Academia. Praha,s 239. ISBN 80-200-1364-4.

Černý V, Hájek M, Bromová M, Čmejla R, Diallo T, Brdička R. 2006. mtDNA of Fulani Nomads and Their Genetic Relationships to Neighboring Sedentary Populations. *Human*

Biology. 78:9-27.

Černý V, Pereira L, Kujanová M, Vašíková A, Hájek M, Morris M, Mulligan CJ. 2009. Out of Arabia- the settlement of island Soqatra as revealed by mitochondrial and Y chromosome genetic diversity. *Am J Phys Anthropol* 138:439–447.

de Knijff P. 2000. Messages through Bottlenecks: On the combined use of slow and fast Evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet.* 67:1055-1061.

di Lernia S. 1999. Discussing pastoralism. The case of the Acacus and surroundings (Libyan Sahara). *Sahara* 11:7-20.

di Lernia S. 2002. Dry climatic events and cultural trajectories: adjusting Middle Holocene pastoral economy of the Libyan Sahara. In: Hassan, F. Droughts, Food and Culture. Kluwer Academic/Plenum, New York. ISBN 978-0-306-47547-4.

Deininger P, Batzer, M. 1993. Evolution of retroposons. *Evolutionary Biology*. New York: Plenum Press, s 157-196.

Eguchi PK, Azarya V. 1993. Unity and diversity of a people. The search for Fulbe identity. In *Senri Ethnological Studies* No. 35. Osaka, National Museum of Ethnology, printed by Nakanishi Printing Co, Kyoto. 232 s. ISSN 0387-6004.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett, I et al. 1994. Identification of remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat. Genet.* 6:130-135.

Graves JAM. 1995. The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes- an evolving understanding. *Bioessays* 258:311-320.

Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise Ch, Angelicheva D, Calafell F, Oefner PJ, Shen P, Tournev I, de Pablo R, Kucinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V, Kalaydjieva L. 2001 Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am J Hum Genet.* 69:1314–133.

Grove AT. 1993. Africa's climate in the Holocene. In Shaw T, Sinclair PJJ, Andah B, Okpoko A. *The archaeology of Africa: Food, metals and towns.* Routledge, London/New York, s 32-42.

Guarino F, Federle L, van Oorschot R, Bernal J, Papiha S, Schanfield M, Mitchell R. 1999. Genetic diversity among five Native American tribes of Columbia: Evidence from nine microsatellites. In *Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, s 33-51.

Hammer MF, Karafet T, Rasanayagam A, Wood ET, Altheide TK, Jenkins T, Griffiths RC, Templeton AR, Zegura SL. 1998. Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. *Mol Biol Evol* 15:427-441.

Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, Zegura SL. 2001. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol Biol Evol* 18:1189-1203.

Hammer MF, Redd AJ, Wood ET, Bonner MR, Jarjanazi H, Karafet TM, Santachiara-Benerecetti S, Oppenheim A, Jobling MA, Jenkins T, Ostrer H, Bonne-Tamir B. 2000. Jewish and Middle Eastern non-Jewish populations share a common pool of Y chromosome biallelic haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6769-6774.

Harding RM, Fullerton SM, Griffiths RC, Bond J, Cox MJ, Schneider JA, Moulin DS, Clegg JB. 1997. Archaic African and Asian lineages in the genetic ancestry of modern humans. *Am. J Hum Genet* 60:772-789.

Harris EE, Hey J. 1999. X chromosome evidence for ancient human histories. *Proceedings of the National Academy of Science* 96:3320-3324.

Hassan FA. 1997. Holocene paleoclimates of Africa, *Afr Archaeol Rev.* 4:213–230.

Hassan FA, 2000. Environmental perception and human responses in history and prehistory. In: R.J. McIntosh, J. Tainter and S.K. McIntosh, Editors, *The Way the Wind Blows: Climate, History, and Human action*, Columbia Univ. Press, New York, s 121–140.

Hassan FA. 2002. Palaeoclimate, food and culture change in Africa: An overview. In: Hassan, F. *Droughts, Food and Culture*. Kluwer Academic/Plenum, New York. ISBN 978-0-306-47547-4.

Hassan HY, Underhill PA, Cavalli-Sforza LL, Ibrahim ME. 2008. Y-chromosome Variation among Sudanese: Restricted gene flow, concordance with language, geography and history. *Am J Phys Anthropol.* 137:316-323.

Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 8:288-294.

Hiernaux J. 1975. *The people of Africa*. New York. Charles Scribner's sons. 1. vyd. 217 s. ISBN 684-14043-8.

Hoelzmann P, Jolly D, Harrison SP, Laarif F, Bonnefille R, Pachur HJ. 1998. Mid-Holocene land-surface conditions in northern Africa and the Arabian Peninsula: a data set for the analysis of biogeophysical feedbacks in the climate system. *Global Biogeochem. Cycles* 12:35-51.

Chiaroni J, Underhill P.A, Cavalli-Sforza, L.L. 2009. Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:20174-20179.

Jobling MA, Tyler-Smith CH. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature.* 4:598-612.

Jobling MA, Hurles M, Tyler-Smith, CH. 2004. *Human evolutionary genetics. Origins, Peoples and Disease*. Garland Publishing. India. 1. vyd. 523 s. ISBN 0815341857

Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Dixon ME, Ricker CE, Seielstad MT, Batzer MA.

2000. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *Am J Hum Genet* 66:979-988.

Kalaydjieva L, Calafell F, Jobling MA, Angelicheva D, de Knijff P, Rosser ZH, Hurles ME, Underhill PA, Tournev I, Marushiakova E, Popov V. 2001. Patterns of inter- and intra-group genetic diversity in the Vlach Roma as revealed by Y chromosome and mitochondrial DNA lineages. *Eur J Hum Genet*.9:97–104.

King TE, Parkin EM, Swinfield G, Cruciani F, Scozzari R, Rosa A, Lim SK, Xue Y, Tyler-Smith Ch, Jobling MA. 2007. Africans in Yorkshire? - the deepest-rooting clade of the Y phylogeny within an English genealogy. *Eur J Hum Genet*. 15:288–293.

Kivisild T, Rootsi S, Metspalu M, Mastana S, Kaldma K, Parik J, Metspalu E, Adojaan M, Tolk H, Stepanov V, Gölge M, Usabga E, Papiha SS, Cinnioglu C, King R, Cavali-Sforza LL, Underhill PA, Willems, R. 2003. The genetic heritage of earliest settlers persist in both the Indian tribal and caste populations. *Am. J. Hum. Genet*. 72:313–332.

Karafet TM, Lansing JS, Redd AJ, Reznikova S, Watkins JC, Surata SP, Arthawiguna WA, Mayer L, Bamshad M, Jorde LB. 2005. Balinese Y- chromosome perspective on the peopling of Indonesia: Genetic contributions from pre-Neolithic Hunter-gatherers, Austronesian farmers, and Indian traders. *Hum Biol*. 77:93-114.

Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura LS, Hammer MF. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res*. 18:830-838.

Karafet TM, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura LS, Hammer MF. 2002. High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life. *Hum. Biol* 74:761-789.

Karafet TM, Xu L, Du R, Wang W, Feng S, Wells RS, Redd AJ, Zegura SL, Hammer MF. 2001. Paternal population history of East Asia: Sources, patterns and microevolutionary processes. *Am J Hum Genet*. 69:615-628.

Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhövel W, Underhill PA, Shen P, Oefner P, Tommaseo-Ponzetta M, Stoneking M. 2003. Reduced Y-chromosome, but not mitochondrial DNA, diversity in human populations from West New Guinea. *Am J Hum Genet.* 72:281-302.

Kujanová M, Pereira L, Fernandes V, Pereira JB, Černý, V. 2009. Near eastern neolithic genetic input in a small oasis of the egyptian western desert. *Am J Phys Anthropol.* 140:336-346.

Lahn BT, Page D. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science.* 278:675-680.

Luis JR, Rowold DJ, Regueiro M, Caeiro B, Cinnioglu C, Roseman C, Underhill PA, Cavali-Sforza LL, Herrera, RJ. 2004. The Levant versus the Horn of Africa: evidence for bidirectional corridors of human migrations. *Am J Hum Genet.* 74:532–544.

Meyer E, Wiegand P, Rand SP, Kuhlmann D, Brack M, Brinkmann B. 1995. Microsatellite polymorphisms reveal phylogenetic relationships in primates. *J Mol Evol.* 41:10-14.

McComb J, Blagitko N, Comuzzie AG, Schanfield MS, Sukernik RI, Leonard WR, Crawford MH. 1995. VNTR DNA variation in Siberian indigenous populations. *Hum Biol.* 67:217-229.

Mitchell R, Howlett S, White N, Federle L, Papiha S, Briceno I, McComb J, Schanfield M, Tyler-Smith C, Osipova L, Livshits G, Crawford MH. 1999. Deletion polymorphism in the human COL1A2 gene: Genetic evidence of a non-African population whose descendants spread to all continents. *Human Biology* 71:901-914.

Mumm S, Molini B, Terrell J, Srivastava A, Schlessinger D. 1997. "Evolutionary features of the 4-Mb Xq21.3 XY homology region revealed by a map at 60-kb resolution." *Genome Res* 7:307-314.

Nachman MW, Crowell SL. 2000. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 156:297-304.

Nasidze I, Risch MG, Robichaux M, Sherry ST, Batyer MA, Stoneking M. 2001. Alu insertion polymorphisms and the genetic structure of human populations from the Caucasus. *Eur J of Hum Genet* 9:267-272.

Ngo KY, Vergnaud G, Johnsson C, Lucotte G, Weissenbach J. 1986. A DNA detecting multiple haplotypes of the human Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 38:407-418.

Pereira L, Černý V, Cerezo M, Silva MN, Hájek M, Vašíková A, Kujanová M, Brdička R, Salas A. 2010. Linking the sub-Saharan and West Eurasian gene pools: maternal and paternal heritage of the Tuareg nomads from the African Sahel . *Eur J Hum Genet.* 1-9.

Pericic M, Lauc LB, Klaric IM, Rootsi S, Janicijevic B, Rudan I, Terzic R, Colak I, Kvesic A, Popovic D, Sijacki A, Behluli I, Thorthovic D, Efremovska L, Bajec ED, Stefanovic BD, Vilems R, Rudan P. 2005. High- resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe (SEE) traces major episodes of paternal gene flow among Slavic populations. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1964–1975.

Petrejčíková E, Soták M, Bernasovská J, Bernasovský I, Sovičová A, Bôžiková A, Boroňová I, Švíčková P, Gabriková D, Mačeková S. 2009. Y-haplogroup frequencies in the Slovak Romany population. *Anthropol Sci* 117:89-94.

Prabhakar U, Eirikis E, Davis, HM. 2002. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay . *J Immunol Methods* 260:207-218.

Quintana-Murci L, Fellous M. 2001. The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *J Biomed Biotech.* 1:18-24.

Rosa A, Ornelas C, Jobling MA, Brehm A, Vilems, R. 2007. Y-chromosomal diversity in the population of Guinea-Bissau:a multiethnic perspective. *BMC Evol Biol.* 7:124-134.

Rubicz RC, Melton PE, Crawford MH. 2007. Molecular markers in anthropological genetics studies. In CRAWFORD, M et al. 2007. *Anthropological Genetics. Theory, Methods and Applications.* Cambridge University Press. 1. vydanie. 476 s. ISBN 9780521546973.

Salem A, Badr F, Gaballah M, Paabo S. 1996. The genetics of traditional living: Y-chromosomal and mitochondrial lineages in the Sinai Peninsula. *Am J Hum Genet* 59:718-726.

Sanchez JJ, Børsting C, Hernandez A, Mengel-Jørgensen J, Morling. 2004. Y chromosome SNP haplogroups in Danes, Greenlanders and Somalis. *International Congress Series* 1261:347-349.

Scozzari R, Cruciani F, Pangrazio A, Santolamazza P, Vona G, Moral P, Latini V, Varesi L, Memmi MM, Romano V, De-Leo G, Gennarelli M, Jaruzelska J, Villems R, Parik J, Macaulay V, Torroni A. 2001. Human Y-chromosome variation in the western Mediterranean area: implications for the peopling of the region. *Hum Immunol.* 62:871-884.

Seielstad MT, Minch E, Cavalli-Sforza LL. 1998. Genetic evidence for a higher female migration rate in human. *Nature Genet.* 20:278-280.

Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Falaschi F, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ 2002. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet* 26:358-361.

Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, de Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S, Marcikie M, Mika A, Mika B, Primorac D, Santachiara-Benerecetti AS, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA. 2000. The genetic legacy of Paleolithic *Homo sapiens sapiens* in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science* 290:1155-1159.

Semino O, Magri CH, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, Maccioni L, Triantaphyllidis C, Shen P, Oefner PJ, Zhivotovsky A, King R, Torroni A, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA, Santachiara-Benerecetti AS. 2004. Origin, diffusion and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am. J. Hum. Gen.* 74:1023-1034.

Shastri BS. 2002. SNP alleles in human disease and evolution. *Human Genetic.* 47:561-566.

Schwartz A, Chan DC, Brown LG, Alagappan R, Pettay D, Disteche C, McGillivray B, de la Chapelle A, et al. 1998. "Reconstructing hominid Y evolution: X- homologous block, created by X-Y transposition, was disrupted by Yp inversion through LINE-LINE recombination." *Hum Mol Genet.* 7:1-11.

Sengupta S, Zhivotovsky LA, King R, Mehdi SQ, Edmonds CHA, Chow CHET, Lin AA, Mitra M, Sil SK, Ramesh A, Rani MVU, Thakur CHM, Cavalli-Sforza LL, Majumder PP, Underhill PA. 2006. Polarity and temporality of high-resolution Y-chromosome distribution in India identify both indigenous and exogenous expansions and reveal minor genetic influence of central Asian pastoralists. *Am J Hum genet.* 78:202-221.

Shi H, Zhong H, Peng Y, Dong YL, Qi XB, Zhang F, Liu LF, Tan SJ, Ma RZ, Xiao CHJ, Wells RS, Jin L, Su B. 2008. Y chromosome evidence of earliest modern human settlement in East Asia and multiple origins of Tibetan and Japanese. *BMC Biol.* 6:45-54.

Shillington K. 2005. *Encyclopedia of African history.* CRC Press. Volume 1. 1824 s. ISBN L-57958-453-S 005.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Reppins S, Pyntikova, Ali TJ, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SH, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen CH, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825-837.

Su B, Xiao J, Underhill PA, Deka R, Zhang W, Akey J, Huang W, Shen D, Lu D, Luo J, Chu J, Tan J, Shen P, Davis R, Cavalli-Sforza LL, Chakraborty R, Xiong M, Du R, Oefner P, Chen Z, Jin L. 1999. *Am J Hum Genet.* 65:1718-1724.

Thompson, Thompson, Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. 2001. *Klinická genetika.* W.B. 6. vyd. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. s. 426. ISBN 80-7254-475-6.
Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, Feldman MW. 2000. Recent commom ancestry of human Y chromosome evidence from DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci.*

USA 97:7360-7365.

The Y chromosome consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal Binary haplogroups. 2002. *Genome Res* 12:339-348.

Tsuchihashi Z, Dracopoli NC. 2002. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics Journal* 2:103-110.

Turner A. 2008. Satiable curiosity. SNPs on Chips: A new source of data for Y-chromosome studies. *Journal of Genetic Genealogy*. 4:iii-iv.

Tyler-Smith C, Jobling MA. 2000. New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection. *Trends Genet.* 16:356–362.

Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonn -Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P, Ibrahim M, Jenkins T, Kidd JR, Mehdi SQ, Seielstad MT, Wells RS, Piazza A, Davis RW, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2000. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature* 26:358-361.

Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Mirazon LM, Foley RA, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. 2001. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet* 65:43-62.

Underhill PA. 2003. Inferring human history: Clues from Y-chromosome haplotype. In *Cold spring symposia on quantitative biology*. Vol 68. Cold spring harbor laboratory press. 0-87069-709-1/04.

Vallone PM, Butler JM. 2004. Y-SNP typing of U.S African American and Caucasian samples using allele-specific hybridization and primer extension. *J Forensic Sci.* 49:723-732.

Vařikov  A, Budinska E, Beli kov  M,  erm k J, Bruchov  H. 2009. Differential gene expression of bone marrow CD34+ cells in early and advanced myelodysplastic syndrome. *Neoplasma* 56:335-42.

Vernet R. 2002. Climate during the late holocene in the Sahara and the Sahel: Evolution and consequences on human settlement. In: Hassan, F. Droughts, Food and Culture. Kluwer Academic/Plenum, New York. ISBN 978-0-306-47547-4.

Wolf J. 1984. Abeceda národů. Výkladový slovník kmenů, národností a národů. Praha: Horizont. 1.vyd, 265 s.

Yu N, Fu YX, Li WH. 2002. DNA polymorphism in a worldwide sample of human X chromosome. Mol Biol Evol. 19:2131-41.

Yu N, Zhao Z, Fu YX, Sambuughin N, Ramsay M, Jenkins T, Leskinen E, Patthy L, Jorde LB, Kuromori T, Li WH. 2001. Global patterns of human DNA sequence variation in a 10-kb region on chromosome 1. Mol. Biol. Evol 18:214-222.

Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. Mol. Biol. Evol. 21:164–175.

Zietkiewicz E, Yotova V, Jarnik M, Laskowska-Korab M, Kidd KK, Modiano D, Scozzari R, Stoneking M, Tishkoff S, Batzer M, Labuda D. 1998. Genetic Structure of ancestral population of modern humans. J Mol Evol. 47:146-155.

Zhao Z, Jin L, Fu YX, Ramsay M, Jenkins T, Leskinen E, Pamilo P, Trexler M, Patthy L, Jorde LB, Ramos-Onsins S, Yu N, Li WH. 2000. Worldwide DNA sequence variation in 10-kilobase noncoding region on human chromosome 22. Proceedings of the National Academy of Science 97:11354-11358.

Internetové zdroje:

<http://www.luminexcorp.com/>

<http://www.marligen.com/>

<http://www.chromosomal-labs.com/>

PRÍLOHY

Príloha 1 Zoznam roztokov a chemikálií použitých v tejto práci

Použité chemikálie

Chemikália	Výrobca
Agaróza	Roth
Ethidium bromid	Sigma
Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)	Roth
Exonukleáza I	Marligen Biosciences
Chlorid sodný (NaCl)	Roth
Kit Signet Y-SNP Identificatin System	Marligen Biosciences
Kontrolná DNA muža	Marligen Biosciences
Kontrolná DNA ženy	Marligen Biosciences
Kyselina bórová (boric acid)	Lach-Ner
Orange G	Chemapol
pUC Mix Marker	Fermentas
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Sacharóza	Roth
Sodium dodecysulfát (SDS)	Roth
Sterilná voda	Roth
Taq Platinum DNA polymeráza	Invitrogen
Tris (báza)	Roth
Tris pH 8.0	Roth

Použité roztoky

Lyzačný roztok

Zloženie lyzačného roztoku: 50 mM Tris pH 8.0
50 mM EDTA
50 mM sacharózy
100 mM NaCl
1% SDS

Príprava lyzačného roztoku (100 ml):

Do kadičky dáme: 1,71 g sacharózy

0,58 g NaCl

1 g SDS (sodium dodecil sulfát=lauryl sulfát)

10 ml 0,5 M Tris ph 8.0

10 ml 0,5 EDTA

doplníme vodou do 100 ml

TBE pufr

Zloženie TBE pufru (1 liter): 54 g Tris base

27,5 g boric acid

20 ml 0,5 EDTA pH 8.0

doplníme vodou do 1 litra

Príloha 2 Kompletné výsledky Fst analýz všetkých 37 populácií

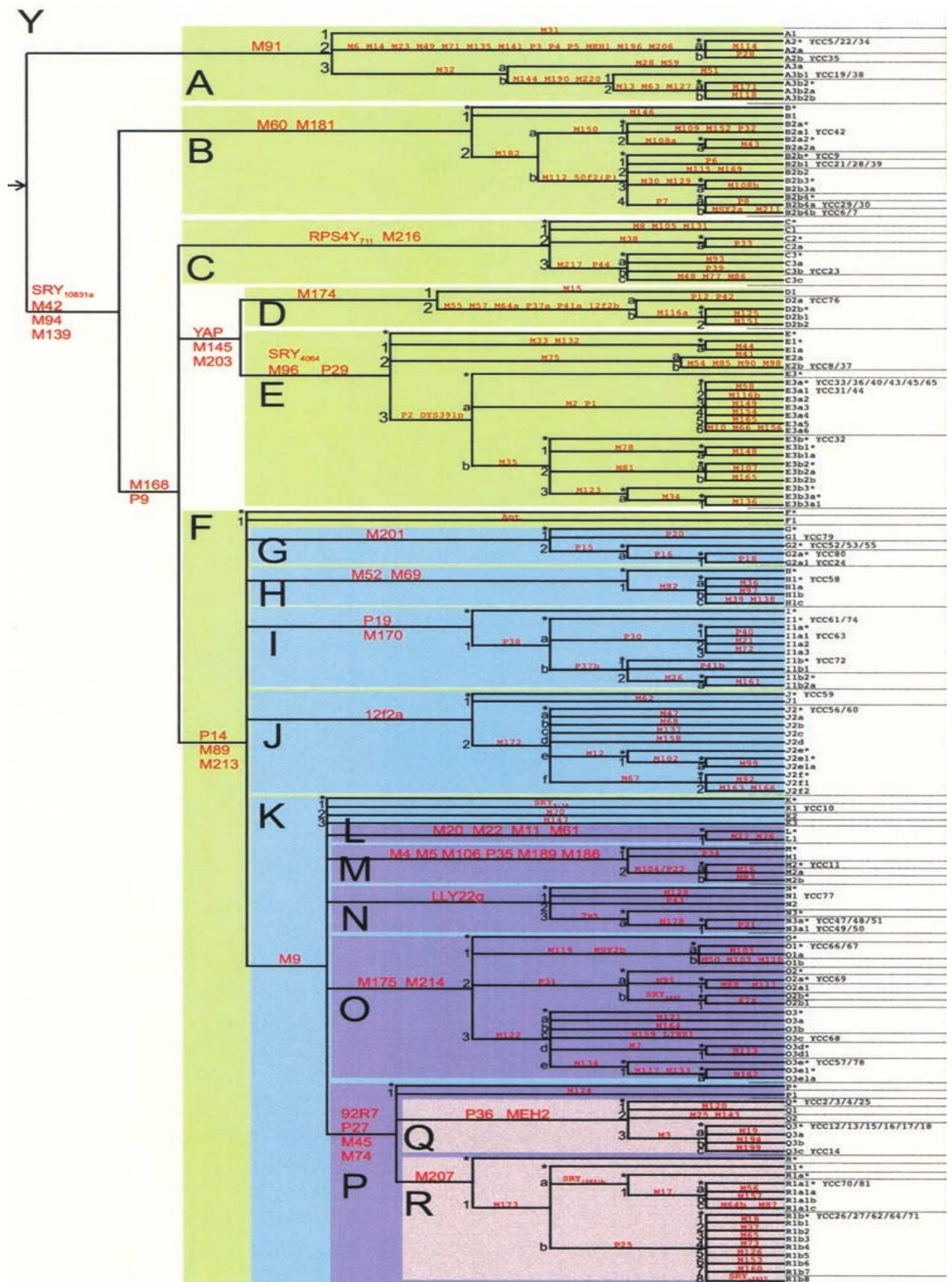
	FDia	FBan	FTin	FAba	FAde	FBal	FDif	FZin	FTch	FBon	FLin	Ttan	Tgor	Tgos	elHayez	Al-Ara	Al-Ber	N-Eg	S-Eg	Tun	M-Ara	NM-Ber	Sah	SM-Ber	Sud	Eth	Mali	C-Afr	S-Afr	Khoi	Somalia	Arabs(Eg)	Bantu(SC)	Wairak(Tn)	Fon(Bn)	Hutu	Tutsi
FDia	0,00000																																				
FBan	-0,02792	0,00000																																			
FTin	0,21954	0,22620	0,00000																																		
FAba	0,04741	0,07119	0,27808	0,00000																																	
FAde	0,09502	0,12655	0,30195	-0,03675	0,00000																																
FBal	0,00266	0,01879	0,11786	-0,01947	-0,00462	0,00000																															
FDif	0,19657	0,24124	0,26503	0,15986	0,12824	0,05982	0,00000																														
FZin	0,16925	0,20273	0,19039	0,16077	0,14007	0,04773	0,06190	0,00000																													
FTch	0,03701	0,03506	0,03765	0,09066	0,11440	0,02638	0,09111	0,05476	0,00000																												
FBon	0,09944	0,10620	-0,00611	0,14267	0,15970	0,00497	0,16178	0,11017	-0,00980	0,00000																											
FLin	0,11716	0,08773	0,12368	0,20504	0,24466	0,07947	0,21189	0,15579	-0,00498	0,07792	0,00000																										
Ttan	0,18927	0,22708	0,22897	0,15302	0,12388	0,05771	0,06161	-0,04645	0,09405	0,14520	0,20512	0,00000																									
Tgor	0,41493	0,45651	0,61361	0,27126	0,25566	0,32031	0,38433	0,39012	0,40013	0,46574	0,53963	0,33499	0,00000																								
Tgos	0,50167	0,55330	0,74325	0,33269	0,31308	0,39532	0,42545	0,42844	0,46693	0,54652	0,65059	0,37277	-0,03896	0,00000																							
elHayez	0,21034	0,25049	0,38755	0,12223	0,12340	0,15993	0,22407	0,24813	0,25234	0,30906	0,32691	0,21985	0,17806	0,19305	0,00000																						
Al-Ara	0,23639	0,27498	0,39882	0,16466	0,16031	0,17965	0,20299	0,23803	0,25966	0,32410	0,33279	0,20075	0,17317	0,20289	0,00157	0,00000																					
Al-Ber	0,26082	0,30585	0,41717	0,16261	0,13853	0,16328	0,13439	0,18048	0,25155	0,32816	0,34348	0,13010	0,14054	0,17557	0,04327	-0,00211	0,00000																				
N-Eg	0,18635	0,22611	0,33240	0,12336	0,11264	0,12990	0,10494	0,14723	0,20529	0,26382	0,27820	0,12227	0,23444	0,25120	0,03544	0,03301	0,02401	0,00000																			
S-Eg	0,30383	0,35266	0,43318	0,25853	0,24295	0,22574	0,11567	0,16871	0,28070	0,35542	0,37325	0,14032	0,39003	0,42047	0,13434	0,08924	0,07970	0,01886	0,00000																		
Tun	0,21853	0,24557	0,35241	0,17198	0,16444	0,18025	0,18321	0,22417	0,24411	0,28878	0,30928	0,18669	0,18881	0,22075	0,03407	-0,00668	0,00082	0,04004	0,06285	0,00000																	
M-Ara	0,21915	0,25142	0,37585	0,12658	0,11622	0,15961	0,21400	0,24336	0,25007	0,30132	0,32216	0,20035	0,05315	0,07484	0,02086	0,01352	-0,00375	0,07148	0,17601	0,04402	0,00000																
NM-Ber	0,31320	0,33620	0,47826	0,20115	0,19466	0,26262	0,37161	0,38700	0,35284	0,39775	0,42571	0,34038	-0,01140	0,00516	0,12086	0,11774	0,09978	0,20590	0,35318	0,14355	0,02199	0,00000															
Sah	0,39157	0,42540	0,56408	0,27199	0,26081	0,32056	0,38098	0,39684	0,40099	0,46371	0,49627	0,34369	0,00396	0,01983	0,11822	0,09825	0,08373	0,19858	0,33615	0,12292	0,01984	-0,00884	0,00000														
SM-Ber	0,38965	0,42211	0,56835	0,25157	0,23935	0,32907	0,41075	0,42455	0,41964	0,47286	0,51041	0,37448	0,00382	-0,01954	0,12670	0,14264	0,12704	0,20795	0,37411	0,16663	0,03518	-0,00078	0,00482	0,00000													
Sud	0,31283	0,35294	0,46894	0,27909	0,30720	0,25178	0,28716	0,30341	0,30873	0,39503	0,40243	0,27338	0,45355	0,48844	0,23902	0,22681	0,25265	0,17736	0,22569	0,21208	0,27317	0,39806	0,41101	0,43120	0,00000												
Eth	0,09074	0,12823	0,31196	0,08033	0,11784	0,09524	0,22605	0,23492	0,17376	0,23965	0,24552	0,22700	0,31450	0,34592	0,13089	0,16502	0,19340	0,12203	0,22515	0,17546	0,17551	0,26397	0,29795	0,29045	0,11505	0,00000											
Mali	0,07474	0,07109	0,22582	0,07316	0,10980	0,05158	0,19899	0,19093	0,08391	0,17033	0,09850	0,19272	0,20581	0,25749	0,16344	0,16152	0,16052	0,17836	0,28037	0,17624	0,13345	0,17406	0,20993	0,23327	0,23848	0,11922	0,00000										
C-Afr	0,16115	0,18523	0,16149	0,21419	0,25342	0,08143	0,23323	0,19393	0,08123	0,10845	0,19301	0,20347	0,50333	0,57189	0,33561	0,33808	0,35887	0,28337	0,35761	0,29562	0,33815	0,43638	0,49074	0,50647	0,24057	0,17613	0,18798	0,00000									
S-Afr	0,11945	0,13572	0,07682	0,20291	0,24404	0,06424	0,26719	0,21453	0,05372	0,04784	0,14746	0,23782	0,50814	0,57737	0,36140	0,37351	0,40101	0,32232	0,41147	0,31831	0,35979	0,44008	0,50519	0,51418	0,34318	0,20312	0,19906	0,01140	0,00000								
Khoi	0,42095	0,45944	0,55991	0,39346	0,42172	0,33895	0,37445	0,37396	0,36929	0,45795	0,50647	0,33908	0,59592	0,65131	0,38928	0,36847	0,39494	0,29935	0,36070	0,30865	0,39315	0,50542	0,54996	0,56388	0,03981	0,21135	0,31298	0,23296	0,36155	0,00000							
Somalia	0,38291	0,41729	0,55850	0,29029	0,30166	0,37998	0,46981	0,47860	0,46092	0,49270	0,52061	0,47069	0,42577	0,41404	0,20466	0,31887	0,36650	0,22640	0,40535	0,32099	0,28836	0,37102	0,41427	0,34004	0,43654	0,26282	0,38888	0,51729	0,51643	0,55214	0,00000						
Arabs(Eg)	0,21221	0,24395	0,33698	0,18502	0,18011	0,17573	0,13225	0,17645	0,22696	0,27500	0,29552	0,15441	0,29558	0,32486	0,08088	0,05137	0,06782	0,01383	-0,00700	0,04189	0,13181	0,25614	0,24524	0,27185	0,17078	0,15981	0,21466	0,26883	0,30073	0,26510	0,30536	0,00000					

p<0,05; červenou farbou sú označené štatistický významné rozdiely

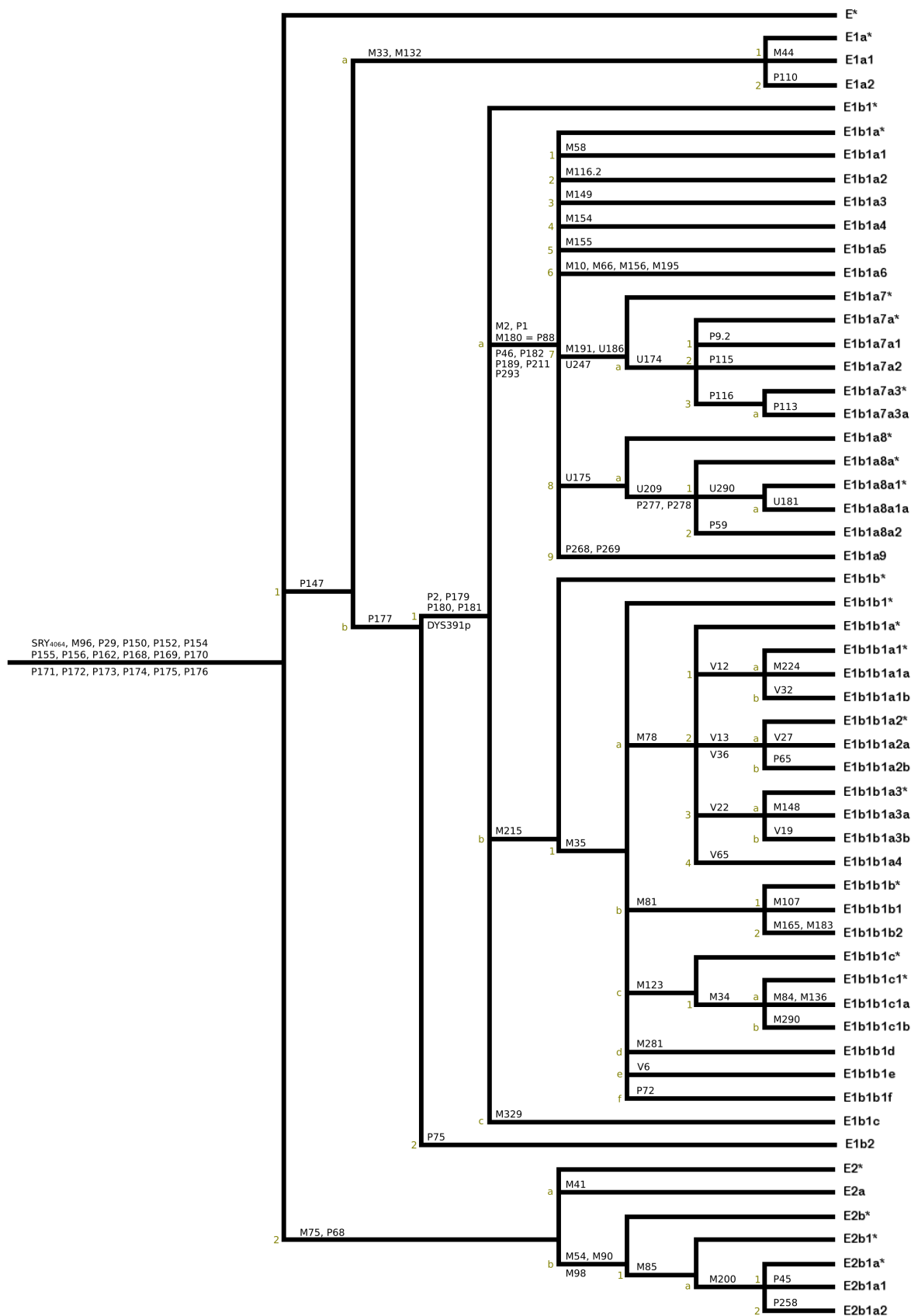
Príloha 3 Kompletne výsledky štatistických analýz programu Arlequin 3.1.

Populácia	Génová diverzita	Primerný počet párových rozdielov	Priemer génovej diverzity na lokus
FDia	0,7700 +/-0,0604	1,326667 +/- 0,853548	0,057681 +/-0,041356
FBan	0,7477+/-0,0493	1,061538 +/-0,725801	0,046154 +/-0,035154
FTin	0,2821 +/-0,1417	0,564103 +/-0,489885	0,024526 +/-0,023942
FAba	0,7143 +/-0,0800	1,895238 +/-1,125585	0,082402 +/- 0,054628
FAde	0,5684 +/- 0,0863	2,084211 +/-1,215337	0,090618 +/-0,059016
FBal	0,7308 +/-0,0963	2,358974 +/-1,373563	0,102564 +/-0,067130
FDif	0,7821 +/- 0,0794	3,871795 +/-2,078042	0,168339 +/-0,101559
FZin	0,6750 +/-0,0853	3,766667 +/-2,003399	0,163768 +/-0,097566
FTch	0,6667 +/- 0,0917	2,181818 +/-1,255438	0,094862 +/-0,060901
FBon	0,4767 +/-0,1154	1,566667 +/-0,966213	0,068116 +/-0,046814
FLin	0,5455 +/-0,0722	1,090909 +/-0,773224	0,047431 +/-0,037927
Ttan	0,7124 +/-0,0743	3,993464 +/-2,093991	0,173629 +/-0,101811
Tgor	0,3856 +/-0,1280	1,359477 +/-0,880500	0,059108 +/-0,042811
Tgos	0,3455 +/-0,1722	0,872727 +/-0,661436	0,037945 +/-0,032443
elHayez	0,7529 +/-0,0314	2,763025 +/-1,498677	0,120132 +/-0,072438
Al-Ara	0,7798 +/-0,0506	2,924370 +/-1,570743	0,127147 +/-0,075921
Al-Ber	0,7427 +/-0,0831	3,391813 +/-1,816149	0,147470 +/-0,088243
N-Eg	0,8879 +/-0,0290	3,732558 +/-1,920414	0,162285 +/-0,092711
S-Eg	0,8744 +/-0,0269	3,211823 +/-1,707397	0,139644 +/-0,082628
Tun	0,7444 +/-0,0241	3,136790 +/-1,635244	0,136382 +/-0,078699
M-Ara	0,6998 +/-0,0667	2,866808 +/-1,537437	0,124644 +/-0,074222
NM-Ber	0,5643 +/-0,0713	1,873016 +/-1,085881	0,081435 +/-0,052352
Sah	0,4064 +/-0,1012	1,783251 +/-1,061742	0,077533 +/-0,051382
SM-Ber	0,5425 +/-0,0895	1,695007 +/-1,013567	0,073696 +/-0,048961
Sud	0,6090 +/-0,0769	2,191026 +/-1,238000	0,095262 +/-0,059794
Eth	0,8302 +/-0,0157	2,244775 +/-1,247907	0,097599 +/-0,060111
Mali	0,7526 +/-0,0281	2,341438 +/-1,303133	0,101802 +/-0,062911
C-Afr	0,5571 +/-0,0566	1,571429 +/-0,958552	0,068323 +/-0,046323
S-Afr	0,5570 +/-0,0638	1,384347 +/-0,865142	0,060189 +/-0,041731
Khoi	0,4534 +/-0,0828	1,322537 +/-0,841451	0,057502 +/-0,040647
Somalia	0,3869 +/-0,0424	1,622090 +/-0,963497	0,070526 +/-0,046355
Arabs(Eg)	0,8902 +/-0,0112	3,452576 +/-1,773388	0,150112 +/-0,085352
Bantu(SC)	0,3846 +/-0,1494	2,186813 +/-1,286274	0,095079 +/-0,062777
Wairak(Tn)	0,6800 +/-0,0400	1,760797 +/-1,041564	0,076556 +/-0,050289
Fon(Bn)	0,0960 +/-0,0393	0,191919 +/-0,244968	0,008344 +/-0,011797
Hutu	0,3116 +/-0,0701	0,849957 +/-0,609828	0,036955 +/-0,029393
Tutsi	0,3429 +/-0,0566	0,942119 +/-0,652443	0,040962 +/-0,031423

Príloha 4 Y chromozómový strom (YCC, 2002) a kompletne vetvenie haploskupiny E a R (Karafet et al., 2008)



Haploskupina E



Haploskupina R

